

# **Der Einfluss von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone während der embryonalen Entwicklung des Gehirns**



**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium**  
**(Dr. rer. nat.)**

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Tina Rüdiger  
geboren am 22.08.1978 in Gera

„Solange das Gehirn ein Geheimnis ist, wird auch das Universum – als Widerschein  
der Struktur des Gehirns – ein Geheimnis bleiben.“

William Feindel

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Jürgen Bolz

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstrasse 1  
07743 Jena, Deutschland

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Siegrid Löwel

Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie  
Erbertstrasse 1  
07743 Jena, Deutschland

**3. Gutachter:** Prof. Dr. Daniela Uziel-Rozental

Federal University of Rio de Janeiro  
Departamento de Anatomia  
ICB – UFRJ  
CCS Bloco F sala 031  
21941-590 Cidade Universitaria Ilha do Fundao  
Rio de Janeiro - RJ, Brasil

**Tag der Disputation:** 21. Juli 2008

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Der Neocortex ist aus horizontalen Schichten und vertikalen Säulen aufgebaut .....	1
1.2. Während der Entwicklung des Neocortex migrieren die neuronalen Vorläuferzellen an ihren Bestimmungsort im Cortex .....	3
1.3. Die Ausbildung von Axon und Dendriten ist ein komplexer Vorgang .....	4
1.4. Molekulare Aspekte der axonalen Wegfindung .....	6
1.5. Die Semaphorine – eine große Gruppe axonaler Lenkungsmoleküle.....	9
1.5.1. Die Proteinfamilie der Semaphorine.....	9
1.5.2. Die Rezeptoren der Semaphorine.....	10
1.5.3. Funktionelle Rolle von Klasse-3-Semaphorinen während der Entwicklung des Nervensystems .....	12
1.5.4. Expression von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C sowie deren Neuropilin- Rezeptoren im embryonalen Cortex.....	15
<b>2. Zielstellung.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1. Material.....	18
3.1.1. Versuchstiere.....	18
3.1.2. Zelllinien .....	18
3.2. Zellbiologische Methoden .....	19
3.2.1. Umgang mit den Zelllinien.....	19
3.2.2. Gewinnung von Membranen aus Zelllinien .....	20
3.2.3. Gewinnung von Membranen aus Gehirngewebe .....	21
3.2.4. Primärkultur: cortikale Einzelzellen und Explantate auf verschiedenen Substraten .....	22
3.2.5. Co-Kultur aus HEK-Zellaggregaten und cortikalen Explantaten .....	27
3.2.6. Primärkultur: Darstellung cortikaler EGFP-Neurone auf coronalen Schnitten.....	28
3.3. Immunhistochemie an cortikalen Explantaten und Einzelzellen.....	29
3.4. Molekularbiologische Methoden .....	30
3.4.1. Besonderheiten im Umgang mit RNA: Arbeiten unter Ribonuklease (RNase)- freien Bedingungen.....	30
3.4.2. RT-PCR zum Nachweis der Semaphorin 3A und Semaphorin 3C Expression in HEK-Zellen .....	30



3.4.3. <i>In-situ</i> -Hybridisierung gegen Semaphorin 3A und Semaphorin 3C an HEK-Zellen .....	34
<b>3.5. Mikroskopie.....</b>	<b>36</b>
<b>3.6. Analyse der <i>in-vitro</i>-Experimente.....</b>	<b>36</b>
3.6.1. Analyse des axonalen Auswachsens an cortikalen Explantaten im Streifenassay .....	36
3.6.2. Analyse der Co-Kultur-Experimente .....	37
3.6.3. Analyse des Verhaltens von cortikalen Einzelzellen in Membrangradienten .....	38
3.6.4. Analyse des Wachstumsverhaltens cortikaler EGFP-Neurone auf coronalen Schnitten.....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Charakterisierung der Zelllinien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und <i>in-situ</i>-Hybridisierung.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	40
4.1.2. <i>In-situ</i> -Hybridisierung .....	42
<b>4.2. Der Einfluss von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone <i>in vitro</i> .....</b>	<b>44</b>
4.2.1. Die Effekte von membrangebundenen Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf cortikale Axone .....	44
4.2.2. Der Einfluss von diffusiblen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf cortikale Axone .....	46
4.2.3. Der Einfluss von membrangebundenen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone von Einzelzellen.....	52
<b>4.3. Der Einfluss einer Mischung von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone <i>in vitro</i> .....</b>	<b>60</b>
4.3.1. Effekte von Membranmischungen aus Semaphorin 3A und 3C auf cortikale Axone .....	60
4.3.2. Der Einfluss von diffusiblen Gradienten aus Semaphorin 3A und 3C auf cortikale Axone .....	63
4.3.3. Der Einfluss von membrangebundenen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone von Einzelzellen.....	67
<b>4.4. Wachstumsverhalten von EGFP-positiven cortikalen Neuronen auf Gehirnschnitten: “Slice overlay“ .....</b>	<b>72</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>75</b>
5.1. <b>Sema3A ist ein repulsives Signal für cortikale Axone .....</b>	<b>77</b>
5.2. <b>Sema3C ist ein attraktives Signal für cortikale Axone .....</b>	<b>78</b>

5.2.1. Der attraktive Effekt von Sema3C wird durch Neuropilin 2 vermittelt.....	79
<b>5.3. Verhalten von kortikalen Axonen in diffusiblen und membrangebundenen Sema3A- und Sema3C-Gradienten .....</b>	<b>82</b>
5.3.1. Kortikale Axone in diffusiblen Sema3A- und Sema3C-Gradienten .....	84
5.3.2. Kortikale Axone von Einzelzellen in membrangebundenen Sema3A- und Sema3C-Gradienten zeigen Orientierungspräferenzen.....	85
<b>5.4. Der kombinatorische Einfluss von Sema3A und Sema3C auf das Wachstumsverhalten kortikaler Axone .....</b>	<b>89</b>
5.4.1. Sema3A-induzierte Repulsion dominiert über Sema3C-vermittelte Attraktion .....	89
5.4.2. Bei gleichzeitigem Vorkommen von Sema3A und Sema3C entscheidet die jeweilige Konzentration über das Wachstumsverhalten der kortikalen Axone .....	90
<b>5.5. Beeinflussung der efferenten kortikalen Projektionen durch Semaphorin-Neuropilin-Interaktionen im „slice overlay“-Assay .....</b>	<b>92</b>
<b>5.6. Ausblick: Weiterführende Studien.....</b>	<b>94</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>96</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>98</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>I</b>
9.1. Verwendete Lösungen.....	I
9.2. Materialien.....	IV
9.2.1. Primer.....	IV
9.2.2. RNA-Sonden.....	IV
9.2.3. Chemikalien.....	V
9.2.4. Antikörper .....	VII
9.2.5. Enzyme.....	VII
9.2.6. Geräte.....	VII
9.3. Abkürzungen.....	IX
9.4. Eidesstattliche Erklärung.....	XI
9.5. Danksagung .....	XII
9.6. Lebenslauf.....	XIV
9.7. Eigene Publikationen.....	XV

# 1. Einleitung

---

Den Aufbau und die Funktionsweise des Gehirns zu erforschen, ist Gegenstand der Neurowissenschaften. Neurowissenschaftler versuchen die Mechanismen der Wahrnehmung, des Denkens und Fühlens zu enträtseln. Außerdem erforscht dieser Wissenschaftsbereich Ursachen neurologischer Erkrankungen und mögliche anwendbare Therapien. Das Gehirn, als Steuerzentrale des Körpers, verarbeitet intrinsische Informationen sowie Informationen aus der Umwelt zu Reaktionen. Dabei bilden die Nervenzellen des Gehirns ein an Komplexität und Leistungsfähigkeit kaum zu übertreffendes Netzwerk. Der am höchsten entwickelte Gehirnbereich, die Großhirnrinde (Neocortex), besteht beim Menschen aus ca.  $10^{12}$  Neuronen. Im Cortex der Maus finden sich 8 Millionen Neurone, wobei jedes Neuron mit etwa 10.000 anderen Nervenzellen über Synapsen in Verbindung steht. Da die Genomgrößen mit ca. 25.000 Genen beim Menschen und ca. 30.000 Genen bei der Maus, kleiner sind als noch vor einigen Jahren angenommen, ist es erstaunlich, wie aus dem scheinbar geringen Informationsgehalt der Zellen, das Gehirn eine derartige Komplexität hervorbringen kann. Dazu müssen zelluläre Entwicklungsprozesse wie Proliferation, Migration, Adhäsion, Wachstum und Differenzierung neuronaler Zellen sowie das Auswachsen neuronaler Fortsätze zur Zielstruktur spezifisch reguliert werden. Die Steuerung der Genexpression, während dieser Entwicklungsprozesse, übernehmen spezifische Regulatorproteine, sogenannte Transkriptionsfaktoren, die räumlich und zeitlich begrenzt, gebildet werden. Besonders Fragen zum Auswachsen der axonalen Fortsätze (axonale Lenkung) stehen im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Ramón y Cajal postulierte schon zu Ende des 19. Jahrhunderts, dass das Wachstum der Axone über einen Wachstumskegel gesteuert wird. Außerdem nahm er an, dass die Axone auf chemotaktischen Wege gelenkt werden. Seit Cajals richtungsweisenden Erkenntnissen hat es noch ein Jahrhundert gedauert, bis die ersten Moleküle identifiziert waren, die dem Axon den richtigen Weg in das neuronale Netzwerk weisen.

## 1.1. Der Neocortex ist aus horizontalen Schichten und vertikalen Säulen aufgebaut

Die Großhirnrinde steuert kognitive Prozesse, die Verarbeitung sensorischer Informationen sowie die willkürliche Ausführung von Bewegungen. Anhand der Furchung der Hirnoberfläche kann der Cortex morphologisch in 4 Lappen eingeteilt werden: Stirn-, Scheitel-, Schläfen- und Hinterhauptslappen. Die Untergliederung in verschiedene Rindenbereiche ist aber nicht nur morphologisch sinnvoll, sondern auch von funktioneller

Bedeutung, da viele motorische und sensorische Funktionen bestimmten Bereichen in der Großhirnrinde zugeordnet werden können. Diese Bereiche, die spezifische Aufgaben in der Informationsverarbeitung haben, werden als sensorische bzw. motorische Areale bezeichnet. Die Ebenen der Informationsverarbeitung betreffend, werden die Bereiche auch als primäre, sekundäre oder tertiäre Areale bezeichnet. So beherbergt der Scheitellappen den primären somatosensorischen Cortex. Der primäre auditorische Cortex liegt am caudalen Ende des Schläfenlappens. Die primäre visuelle bzw. motorische Informationsverarbeitung findet dagegen im Hinterhaupts- bzw. Stirnlappen statt. Charakteristisch für die cortikalen Areale ist deren topografische Organisation, d.h. die räumliche Beziehung der Rezeptoren in der Peripherie wird im Cortex beibehalten. In drei großen Assoziationsfeldern des Cortex werden dann die Reize der verschiedenen Sinnessysteme zusammengeführt. Diese Integration von sensorischer Funktion sowie die Planung und Durchführung von komplexen motorischen Handlungen ist Aufgabe der assoziativen Areale. Diese Areale sind außerdem für höhere kognitive Leistungen des Menschen, wie Wahrnehmung, Sprache und Gedächtnis verantwortlich. Das visuelle assoziative Areal besteht z.B. aus mehr als 20 cortikalen Arealen.

Die Neurone im Neocortex können in Pyramidenzellen und Nicht-Pyramidenzellen unterschieden werden. Die Pyramidenzellen sind Projektionsneurone mit einem pyramidenförmigen Zellkörper, deren apikaler Dendrit weit in Richtung Pia mater den Cortex durchdringt. Zu den Nicht-Pyramidenzellen zählen u.a. die kugelförmigen Sternzellen, deren Dendriten radial vom Zellkörper auswachsen. Aufgrund des Vorkommens der verschiedenen Zelltypen, und deren unterschiedliche Größe und Packungsdichte, weist der Neocortex eine 6-schichtige horizontale Gliederung auf. So liegen die Zellkörper der Pyramidenzellen vor allem in den Schichten 2/3, 5 und 6, die Nicht-Pyramidenzellen hingegen vorrangig in Schicht 4. Schicht 4 stellt die Haupteingangsstation afferenter Fasern aus dem Thalamus dar. Interlaminare Projektionen sichern die Verbindung der verschiedenen Schichten des Cortex miteinander, so senden z.B. Schicht-4-Neurone Axonkollaterale in Schicht 2/3 aus. Machen die oberen Cortexschichten vor allem corticocortikale Verbindungen, so stellen Schicht 5 und Schicht 6 hauptsächlich Ausgangsstationen zu subcortikalen Bereichen dar (Caviness und Frost, 1980; Gilbert, 1983).

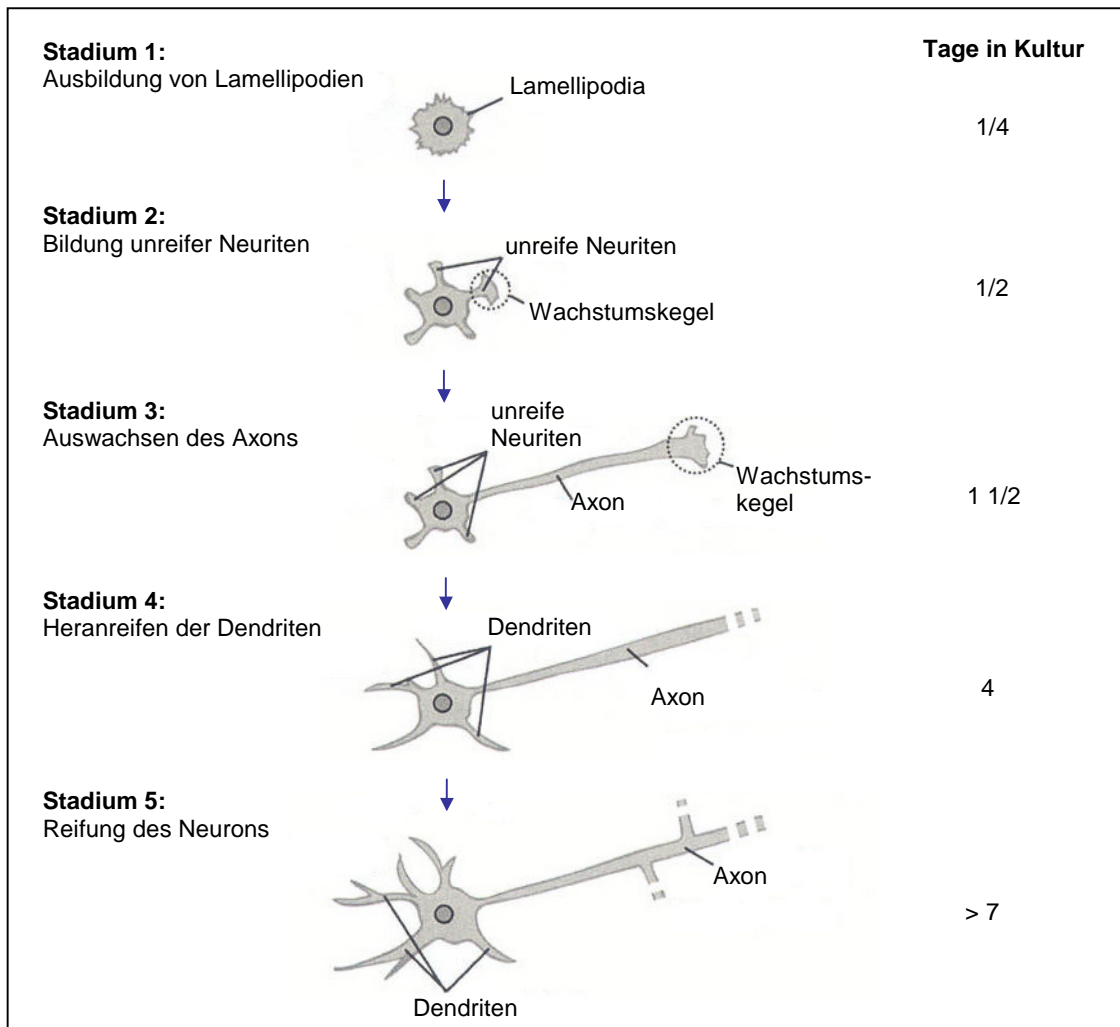
Neben der laminaren Organisation, existiert darüber hinaus eine kolumnäre Organisation des Cortex, d.h. der Neocortex ist in vertikalen Säulen (Kolumnen) organisiert, die sich durch alle 6 Schichten erstrecken. In einer Kolumne übereinanderliegende Neurone besitzen ähnliche physiologische Eigenschaften und antworten auf die gleichen Reizparameter. Durch intralaminare Projektionen werden funktionell ähnliche Kolumnen miteinander verbunden (Hubel und Wiesel, 1963).

## **1.2. Während der Entwicklung des Neocortex migrieren die neuronalen Vorläuferzellen an ihren Bestimmungsort im Cortex**

Das gesamte Nervensystem eines Säugetiers ist ektodermaler Herkunft, und entwickelt sich somit aus dem äußeren Keimblatt des Embryos. Die Neuronen des Cortex gehen aus neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) während der frühen Embryogenese hervor. Die Vermehrung der Neuroblasten verläuft in der Ventrikularzone, einer an der Ventrikelseite lokalisierten Proliferationszone der Großhirnrinde. Nach der Mitose müssen die Neuroblasten aber erst zu ihrem eigentlichen Bestimmungsort in der Großhirnrinde in Richtung Pia mater wandern (Migration). So bilden sich durch Auswanderung der Neuroblasten aus der Proliferationszone nach und nach die 6 cortikalen Schichten aus. Dabei erfolgt die Schichtenbildung nach dem sogenannten „inside-out“-Prinzip. Zunächst entstehen die unteren Cortexschichten, erst danach die oberen Schichten. Dazu müssen die Neurone, die ihren Bestimmungsort in den oberen Schichten haben, an den Neuronen in den unteren Schichten vorbeiwandern (Angewine und Sidman, 1961). Diese Art der Migration wird hauptsächlich von den späteren Pyramidenzellen des Cortex vollzogen, und wird radiale Migration genannt. Zwei Formen der radialen Migration waren bisher bekannt. In frühen Stadien der Cortexentwicklung wandern die Neurone, indem sie zunächst einen Fortsatz aussenden und dann den Zellkörper nachziehen. Diese Form der Migration wird auch als Soma-Translokation bezeichnet. Während der späteren Stadien der cortikalen Entwicklung wandern die Neurone dann entlang von Fortsätzen radialer Gliazellen in Richtung Pia mater (Nadarajah, 2003; Nadarajah et al., 2003; Rakic, 1972). Neben der radialen Migration existiert die tangentielle Migration der cortikalen GABAergen Interneuronen in den Cortex. Verläuft die radiale Migration senkrecht zu den entstehenden cortikalen Schichten, so wandern die Interneurone zunächst parallel zu den Schichten. Die Vorläufer der GABAergen Interneuronen werden dabei vorrangig in den ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalons gebildet (Anderson et al., 2001; Marin und Rubenstein, 2001; Nadarajah und Parnavelas, 2002). Neuere Untersuchungen haben die Existenz eines dritten Modi der Migration aufgezeigt, die multipolare Migration. Dabei wandern die Zellen unabhängig von den radialen Gliazellen, in radialer sowie auch in tangentialer Richtung innerhalb des sich entwickelnden Cortex. Die migrierenden Zellen verhalten sich sehr dynamisch, indem sie ihre Migrationsrate und Migrationsrichtung oft ändern, und vielfach Zellfortsätze aussenden und zurückziehen (Tabata und Nakajima, 2003).

### **1.3. Die Ausbildung von Axon und Dendriten ist ein komplexer Vorgang**

Um letztendlich ein funktionelles Nervensystem zu bilden, senden die Neurone, sobald sie an ihren Bestimmungsort im Cortex angekommen sind, axonale und dendritische Fortsätze aus, und stellen somit den Kontakt zu anderen Nervenzellen her. Ein ausgereiftes Neuron ist strukturell und funktionell in ein einzelnes langes Axon sowie in mehrere kürzere Dendriten organisiert. Das axonale und dendritische Kompartiment unterscheiden sich dazu in der Zusammensetzung ihrer Organellen und der spezifischen Proteine. Die Prozesse zur Ausbildung von Axon und Dendriten, sowie deren spezifischen Eigenschaften, verlaufen während der frühen neuronalen Entwicklung, und werden unter dem Begriff neuronale Polarität zusammengefasst (Yoshimura et al., 2006). Die Arbeitsgruppe um Dotti untersuchte bereits vor 20 Jahren die Vorgänge der Entstehung der neuronalen Polarität anhand von kultivierten Neuronen des embryonalen Hippocampus der Ratte (Dotti et al., 1988). Dabei durchlaufen die Neurone innerhalb einer Periode von 7 Tagen 5 Stadien, in denen die Morphologie der Neurone drastisch variiert (Abb. 1.1). Zunächst bildet das hippocampale Neuron eine Vielzahl von fühlerartigen Ausstülpungen der Zellmembran, sogenannte Lamellipodien aus (Stadium 1). Im 2. Stadium entwickeln sich aus den Lamellipodien unreife Neuriten, wobei ein Neurit sich sehr schnell zu einem Axon verlängert (Stadium 3). Im darauffolgenden 4. Stadium wachsen die verbleibenden Neuriten langsam aus und erlangen dendritische Charakteristika. Das 5. Stadium ist dadurch gekennzeichnet, dass die kultivierten hippocampalen Neurone synaptische Kontakte ausbilden. Der entscheidende Schritt bei der Entstehung der neuronalen Polarität ist ohne Zweifel die Ausbildung des Axons, was komplexe Prozesse der Membranneubildung und -umlagerung sowie eine Reorganisation des Zytoskeletts erfordert (Bradke und Dotti, 2000b; Fukata et al., 2002; Horton und Ehlers, 2003; Yoshimura et al., 2006). Die so erlangte Polarität des Neurons ist nicht starr, sondern reversibel. Wird z.B. das Axon eines Neuron im 4. Stadium durchtrennt, so entwickelt sich aus einem Dendriten das neue Axon (Bradke und Dotti, 2000a).



**Abb. 1.1: Ausbildung der neuronalen Polarität.** Die Stadien 1 bis 5 weisen jeweils spezifische morphologische Charakteristika der Neuronen auf. So verlängert sich z.B. während des 3. Stadiums, nach ca. 24 h in Kultur, ein Neurit massiv und erlangt axonale Charakteristika. Nach weiteren 3 Tagen wachsen die verbleibenden Neuriten im 4. Stadium zu Dendriten aus (Abbildung modifiziert nach Yoshimura et al., 2006).

Da verschiedenartige Nervenzellen in Kultur eine neuronale Polarität ohne äußeren Einfluss entwickeln, scheint ein festgelegtes intrinsisches Programm in den Zellen zu existieren. Im Gegensatz dazu scheinen aber auch extrinsische Faktoren auf die Entwicklung der neuronalen Polarität einen Einfluss zu haben. Verschiedenen Molekülen der extrazellulären Matrix (ECM) wird dabei eine große Rolle zugeschrieben. So entwickeln z.B. kultivierte sympathische Neurone der Ratte auf Laminin als Substrat eine Vielzahl von Axonen, auf Poly-L-Lysin dagegen nur ein Axon. In beiden Fällen unterblieb die Ausbildung von Dendriten. Eine Vielzahl von Dendriten sowie ein Axon, wurde dagegen durch Matrigel, einer komplexen Mischung verschiedener ECM-Proteine, induziert (Craig und Banker, 1994; Esch et al., 1999; Lein und Higgins, 1989).

## 1.4. Molekulare Aspekte der axonalen Wegfindung

Nach der Migration der Neurone zu ihrem Bestimmungsort im sich entwickelnden Gehirn und Entfaltung der neuronalen Polarität der Zelle, senden die Neurone Axone zu einer Zielstruktur aus, um letztendlich die neuronale Konnektivität herzustellen. Wie aber navigiert ein Axon durch ein sich entwickelndes Gehirn mit tausend von anderen Axonen zum korrekten Ziel? Und welche Mechanismen unterliegen der Erkennung der Zielstruktur?

Wie schon erwähnt beschrieb Ramón y Cajal bereits vor 100 Jahren den Wachstumskegel und vermutete, dass sich Nervenfortsätze während des Wachstums an chemischen Signalen orientieren. Tatsächlich stellt der Wachstumskegel den sensorischen und motorischen Apparat des Axons dar. Indem der Wachstumskegel mit seinen Fortsätzen die unmittelbare Umgebung des Axons abtastet, navigiert er das Axon zu seinem Bestimmungsort und spielt somit eine zentrale Rolle bei der axonalen Wegfindung. Es existieren zwei Arten von Fortsätzen am Wachstumskegel, schmale fingerförmige Filopodien und breitere Lamellipodien, die beide Ausstülpungen der Zellmembran darstellen. Durch Richtungswechsel und Verzweigung sowie Kollaps und Neubildung der Filopodien, erkundet der Wachstumskegel die Umgebung des Axons. Dabei sind wachsende Axone einer Vielzahl von unterschiedlichen Substraten, z.B. Zellmembranen anderer Neurone, anderen Axonen, ECM-Proteinen, Zelladhäsionsmolekülen und verschiedenen diffusiblen Molekülen ausgesetzt (Hübener et al., 1995; Landis, 1983; Mann et al., 1998). Diese extrazellulären Signale ermöglichen dem auswachsenden Axon eine gerichtete Navigation, wobei auf der Oberfläche des Wachstumskegels und entlang des Axons eine Vielzahl von Rezeptoren lokalisiert ist. Die Rezeptoren ermöglichen erst mit den vielfältigen extrazellulären Signalen eine Ligand-Rezeptor-Interaktion, und somit eine Reaktion des Wachstumskegels auf die extrazelluläre Umgebung.

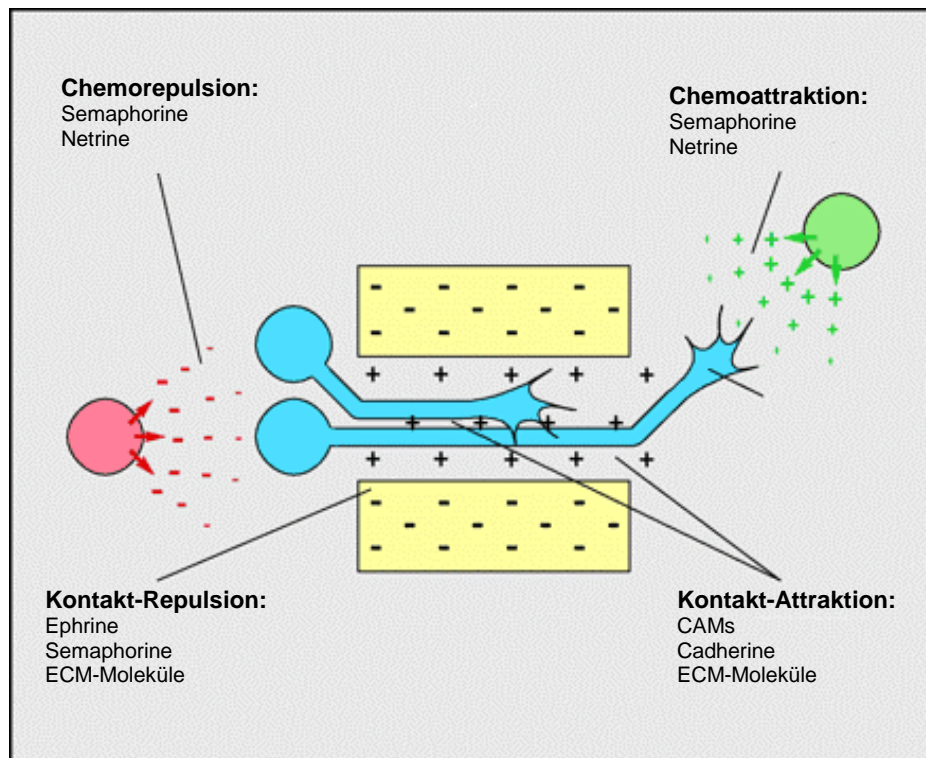
Die Grundlage für den Beginn der Entschlüsselung des Mechanismus der axonalen Wegfindung lieferte Roger Sperry, der 1963 die Chemoaffinitätshypothese formulierte. Durch seine Experimente am visuellen System des Molches, schlussfolgerte er, dass wachsende Axone aufgrund chemischer Marker ihre Zielzellen erkennen (Sperry, 1945). Die Weiterentwicklung vieler biochemischer und molekularbiologischer Methoden führte schließlich in den 80-er und 90-er Jahren des 20. Jahrhunderts und bis zum heutigen Zeitpunkt zur Identifizierung einer Vielzahl von axonalen Lenkungsmolekülen sowie deren Rezeptoren. Die axonalen Lenkungsmoleküle können demnach auf das Verhalten der Axone attraktiv oder repulsiv wirken, d.h. sie können eine anziehende oder abstoßende Wirkung haben. Zudem können die Lenkungsmoleküle substratgebunden oder diffusibel sein und über weitere Distanzen oder aus der unmittelbaren Umgebung des Wachstumskegels das



axonale Verhalten beeinflussen (Bolz und Castellani, 1997; Caroni, 1998; Dickson, 2002; Goodman, 1996; Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Diese grundlegenden Aussagen zur Funktion der axonalen Lenkungsmoleküle waren erst durch den Einsatz verschiedener *in-vitro*-Versuchssysteme, wie dem Membranstreifen-Versuch, dem Kollagen-Ko-Kulturversuch und dem System zur Untersuchung des Wachstumskegellapses möglich. Beim dem von Friedrich Bonhoeffer entwickelten Membranstreifen-Versuch, werden den auswachsenden Axonen zwei verschiedene Membranstreifen zur Wahl angeboten. Indem die Axone ein bestimmtes Substrat meiden oder bevorzugen, dient dieses Versuchssystem der Analyse des axonalen Wachstumsverhaltens auf verschiedenen Substraten (Baier und Klostermann, 1994; Müller et al., 1990; Walter et al., 1987). Dagegen kann beim dreidimensionalen Kollagen-Ko-Kulturversuch der Einfluss diffusibler Lenkungsmoleküle auf auswachsende Axone untersucht werden. Dazu werden Gewebestückchen, welche die Neuronen von Interesse enthalten, in direkter Nachbarschaft zu anderen Gewebestückchen in einer Matrix aus Kollagen oder Plasma ko-kultiviert. Neben neuronalem Gewebe werden auch Zellaggregate aus Zelllinien verwendet, die z.B. ein bestimmtes Lenkungsmolekül überexprimieren und sezernieren, so dass sich in der Matrix ein diffusibler Gradient des Lenkungsmoleküls aufbaut. Allen Versuchsansätzen ist gemein, dass das axonale Wachstumsverhalten in Bezug auf die Quelle der Lenkungsmoleküle hin untersucht wird (Guthrie und Lumsden, 1994; Lumsden und Davies, 1983). Der dritte wichtige *in-vitro*-Versuchsansatz zur Untersuchung des Wachstumskegellapses wurde von Raper und Kapfhammer entwickelt. Ursprünglich wurden verschiedene Membransuspensionen dem Kulturmedium zugefügt und anschließend die Veränderungen der Wachstumskegelmorphologie analysiert. Eine erhöhte Anzahl kollabierter Wachstumskegel deutete dabei auf inhibitorische oder repulsive Komponenten hin. Unter Verwendung dieses Versuchsansatzes konnte z.B. Semaphorin 3A eine repulsive Wirkung auf cortikale Axone zugewiesen werden (Bagnard et al., 1998; Raper und Kapfhammer, 1990).

Die attraktiv oder repulsiv wirkenden Lenkungsmoleküle fungieren aber nicht nur als „stop or go“-Signale, vielmehr wird der Wachstumskegel durch eine kontinuierliche Integration beider Signale navigiert (Stoeckli, 1997). Oftmals wirkt ein Lenkungsmolekül, abhängig von der Rezeptorausstattung des Wachstumskegels, attraktiv oder repulsiv. Diese Bifunktionalität tritt z.B. bei einigen Mitgliedern der Semaphorine auf; Semaphorin 3D wirkt beispielsweise attraktiv oder repulsiv auf kommissurale Axone des Zebrafisches (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995; Wolman et al., 2004). Darüber hinaus können einige axonale Lenkungsmoleküle aber nicht nur attraktiv oder repulsiv wirken, sondern auch z.B. Axonverzweigung oder Axonlänge beeinflussen, also „multifunktional“ wirken (Bagnard et al., 1998; Castellani et al., 1998).



**Abb. 1.2: Mechanismen der axonalen Lenkung.** Durch Chemorepulsion, Chemoattraktion, Kontakt-Repulsion und Kontakt-Attraktion werden die Axone navigiert. Zu jedem Mechanismus sind Beispiele für axonale Lenkungsmoleküle angegeben. Einige Lenkungsmoleküle sind bifunktionell, d.h. sie wirken sowohl attraktiv als auch repulsiv auf das axonale Wachstumsverhalten (Abbildung modifiziert nach Tessier-Lavigne und Goodman, 1996).

Abb. 1.2 gibt einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen der Axonlenkung sowie über die dazugehörigen Lenkungsmoleküle. Die ersten Kandidaten für mögliche axonale Lenkungsmoleküle waren die Zelladhäsionsmoleküle (CAMs), wie z.B. Integrine, Cadherine und neuronale Zelladhäsionsmoleküle (NCAMs), wobei diese aber vielmehr ein Substrat für auswachsende Axone darstellen und deren Auswachsen fördern. CAMs sind integrale Membranproteine, die Kontakte zwischen Zellen (Zell-Zell-Adhäsion) sowie zwischen Zellen und der ECM (Zell-Matrix-Adhäsion) vermitteln. Sie assoziieren Axone zu Faszikeln oder Bündeln. Wenig verstanden ist aber bis jetzt die Balance zwischen Faszikulation, Reaktion auf axonale Lenkungsmoleküle und Defaszikulation (Chilton, 2006; Kiryushko et al., 2004; Lilienbaum et al., 1995; Walsh und Doherty, 1997).

Zu den prominentesten und am besten untersuchten Lenkungsmolekülen gehören Ephrine, Netrine, Semaphorine und Slit. Den Ephrinen wird vornehmlich eine repulsive Aktivität bei der Ausbildung verschiedener topographischer Projektionen zugeschrieben, wie z.B. im thalamocortikalen und im retinotectalen System (Cheng et al., 1995; Drescher et al., 1995;

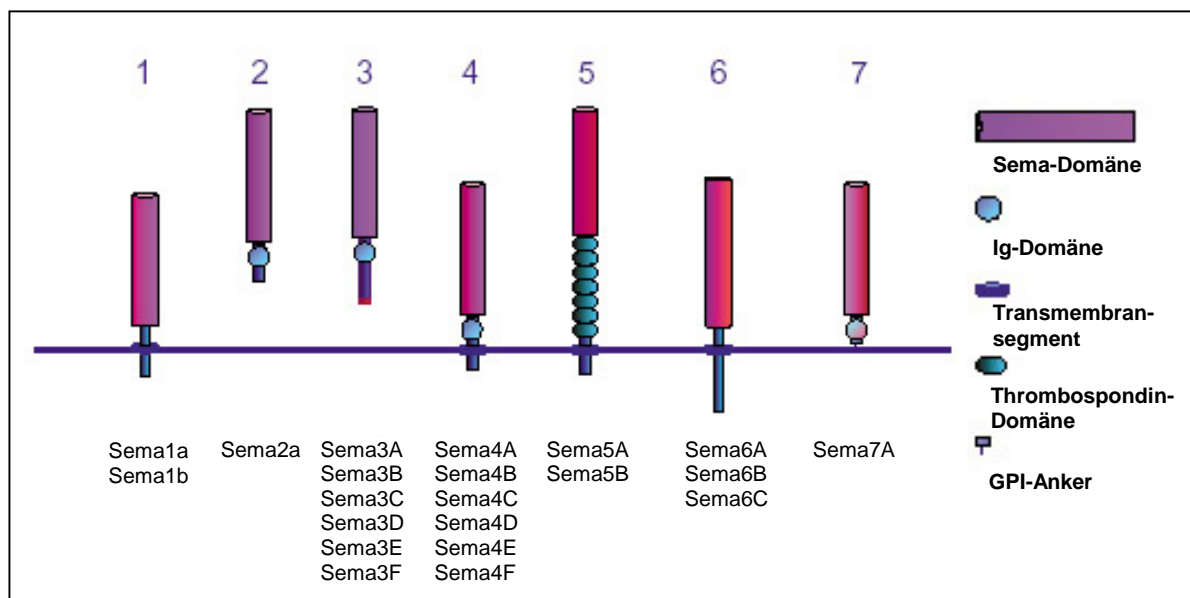
Uziel et al., 2002). Inzwischen gibt es aber auch eine Reihe von Studien, die zeigen, dass Ephrine attraktive Effekte ausüben können (Castellani et al., 1998; Mann et al., 2002). Die Vertreter der Ephrine, die man in zwei Klassen A und B einteilt, können ihre Rezeptoren nur in membrangebundener Form aktivieren. Ephrin-Rezeptoren (Eph-Rezeptoren) stellen mit 14 bekannten Vertretern die größte Familie der Rezeptortyrosinkinasen dar (Drescher, 1997; Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Die Netrine, als eine kleine Gruppe von phylogenetisch stark konservierten multifunktionellen Lenkungsmolekülen, haben sowohl attraktive als auch repulsive Eigenschaften. Netrin-1, sezerniert durch die Bodenplatte („floor plate“), war die erste identifizierte, auf kommissurale Axone wirkende, chemoattraktive Substanz (Kennedy et al., 1994; Serafini et al., 1994). Später wurde der repulsive Effekt von Netrin-1 auf trochleare Axone gezeigt (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995). Eine weitere Gruppe der Lenkungsmoleküle, die Slit-Proteine, sind wie die Netrine multifunktional. Intensiv untersucht sind die Effekte von Slit in *Drosophila*, wo es von der ventralen Mittellinie sezerniert wird und kommissurale Axone, die den zum Slit passenden Rezeptor Robo tragen, an der Überquerung der Mittellinie hindert (Kidd et al., 1998; Stoeckli und Landmesser, 1998). Dieser repulsive Effekt des Slit ist in Vertebraten konserviert geblieben (Brose et al., 1999). Zur Familie der Semaphorine zählen zur Zeit mehr als 30 diffusible oder membrangebundene Proteine. Auf deren Funktion während der Entwicklung des Nervensystems sowie auf die Semaphorin-Rezeptoren soll im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden.

## **1.5. Die Semaphorine – eine große Gruppe axonaler Lenkungsmoleküle**

### **1.5.1. Die Proteinfamilie der Semaphorine**

Zu Beginn der 90-er Jahre wurden fast gleichzeitig zwei Mitglieder der Semaphorin-Proteinfamilie molekular charakterisiert, das Semaphorin 3A (Sema3A, ursprünglich Kollapsin-1) und das Semaphorin 1a (Sema1A, ursprünglich Fasciclin IV). Dies war der Auftakt zur Bildung einer der größten Proteinfamilie (Abb. 1.3), deren Mitglieder als axonale Lenkungsmoleküle die Entwicklung des Nervensystems steuern (Kolodkin et al., 1993; Kolodkin et al., 1992; Luo et al., 1993). Basierend auf ihrer molekularen Struktur wurden die Mitglieder der Semaphorine in 8 Klassen eingeteilt. Die Klassen 1 und 2 enthalten ausschließlich Semaphorine der Invertebraten, dagegen sind die Semaphorine der Klassen 3 bis 7 bei Vertebraten zu finden. Die Klasse 8 repräsentiert ausschließlich virale Semaphorine. Semaphorine treten als lösliche Proteine (Klassen 2 und 3) oder als Transmembranproteine (Klassen 1, 4, 5 und 6) auf. Semaphorine der Klasse 7 sind dagegen mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an die Zellmembran gebunden

(Koncina et al., 2007; Raper, 2000). Die molekulare Größe der Proteine variiert im Bereich von 400 bis 1000 Aminosäuren (AS). Alle Semaphorine sind durch eine hochkonservierte Domäne am N-Terminus charakterisiert (Sema-Domäne). Die Sema-Domäne, welche auch bei Plexinen vorkommt, ist ca. 500 AS lang und beinhaltet 14 bis 16 konservierte Cystein-Reste sowie eine N-Glykolisierungsstelle. Der C-Terminus der Semaphorine ist dagegen von Klasse zu Klasse unterschiedlich. So treten z.B. nur bei Klasse 5-Semaphorinen 7 Thrombospondin-Domänen auf. Die meisten Semaphorine (Klassen 2 bis 4 und 7) verfügen hingegen über eine Immunglobulin-Domäne (Ig-Domäne), die u.a. zur Ausbildung von Semaphorin-Dimeren sowie zur Bindung an andere Proteine notwendig ist (Goodman, 1996; Kolodkin, 1996; Kruger et al., 2005; Püschel, 1999).



**Abb.1.3: Die Semaphorin-Proteinfamilie.** Die löslichen und membrangebundenen Mitglieder der Semaphorin-Proteinfamilie kommen bei Invertebraten (Klasse 1 und 2), bei Vertebraten (Klassen 3-7) und in Viren (Klasse 8, nicht dargestellt) vor. Die Sema-Domäne am N-Terminus ist bei allen Semaphorin-Proteinen hochkonserviert. Der C-Terminus enthält klassenspezifische Sequenzen. Zu jeder Klasse sind einige bekannte Mitglieder aufgelistet. Sema = Semaphorin, Ig = Immunglobulin, GPI = Glykosylphosphatidylinositol. (Abbildung modifiziert nach Püschel, 1999).

### 1.5.2. Die Rezeptoren der Semaphorine

Die Wirkung der verschiedenen membrangebundenen Semaphorine wird zum einen über die Bindung an Plexine vermittelt. Zum anderen benötigen die sezernierten Semaphorine der Klasse 3 einen Plexin-Neuropilin-Rezeptorkomplex, um ihre Wirkung zu entfalten (Dickson, 2002; Takahashi et al., 1999).

## **Plexine - Rezeptoren der membrangebundenen Semaphorine**

Die Plexine sind ca. 240 kDa große Transmembranproteine. Die 9 Mitglieder der Plexin-Proteinfamilie werden auf der Basis ihrer Homologie in 4 Subfamilien A bis D aufgeteilt. Folgende Plexine sind in den Subfamilien vertreten: A1 - A4, B1 - B3, C1 und D1. Die extrazelluläre Domäne der Plexine setzt sich aus einer Sema-Domäne am N-Terminus, sowie Cystein-reichen Motiven, Glycin-Prolin-reichen Motiven und einer Met-ähnlichen Sequenz zusammen. Der cytoplasmatische Anteil der Semaphorin-Rezeptoren ist durch eine SP-Domäne (Sex-Plexin-Domäne), welche Phosphorylierungsstellen besitzt, charakterisiert. Die Plexine formen untereinander Homo- und Heterodimere (He et al., 2002; Koncina et al., 2007; Tamagnone et al., 1999; Winberg et al., 1998b). Wie schon erwähnt binden nur die viralen, membrangebundenen und GPI-verankerten Semaphorine an die Plexine, dabei fungieren die verschiedenen Typen von Plexinen als Rezeptoren für unterschiedliche Semaphorine (Chilton, 2006). So bindet z.B. Sema5A an Plexin B3 (Artigiani et al., 2004), Sema3E an Plexin D1 (Chauvet et al., 2007; Gu et al., 2005) und Sema6A an Plexin A4 (Suto et al., 2005). Somit sind die Plexine bei den membrangebundenen Semaphorinen für die Ligandenbindung verantwortlich und setzen außerdem die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang.

## **Neuropiline – Rezeptoren der sezernierten Semaphorine**

Für die Ligandenbindung der Klasse-3-Semaphorine sind hingegen die Neuropiline verantwortlich. Die Neuropiline fungieren neben den Plexinen als Co-Rezeptoren für die Semaphorin-Bindung. Neuropilin 1 war der erste identifizierte Semaphorin-Rezeptor (He und Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Daneben existiert ein Neuropilin 2, das zu Neuropilin 1 ca. 44% Sequenzhomologie aufweist (Chen et al., 1997; Koncina et al., 2007). Die Neuropiline sind Transmembranproteine mit einer molekularen Größe von etwa 130 kDa. Sie verfügen über eine große extrazelluläre Domäne und eine relativ kurze intrazelluläre Domäne, der jegliche enzymatische Aktivität fehlt. Der extrazelluläre Anteil des Rezeptormoleküls besteht hauptsächlich aus 3 funktionell verschiedenen Proteinmotiven: die CUB-, FV- und MAM-Domäne. Die MAM-Domäne ist z.B. an Proteininteraktionen beteiligt, und ermöglicht die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren zwischen Neuropilin 1 und 2. Zur Bildung eines funktionellen Semaphorin-Rezeptors ist wie bei den Plexinen eine Dimerisierung der Neuropilinmoleküle notwendig; dies stellt außerdem eine notwendige Voraussetzung für die Semaphorin-Bindung dar (Chen et al., 1998; Koncina et al., 2007; Zondag et al., 1995). Die Bindungsspezifitäten der Klasse-3-Semaphorine für Neuropilin 1 und 2 sind verschieden. So bindet z.B. Sema3A an Neuropilin 1, aber nicht an Neuropilin 2. Dagegen bindet Sema3F an Neuropilin 2 mit einer höheren Affinität als an Neuropilin 1. Mit annähernd gleicher Affinität bindet Sema3C an Neuropilin 1 und 2 (Chen et al., 1997; Giger

et al., 1998; He und Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ligandenbindung der Klasse-3-Semaphorine über die Neuropiline funktioniert, die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade wird dann durch die Plexine getriggert. Ein funktioneller Rezeptorkomplex von Sema3A besteht demnach aus Neuropilin 1, sowie einem der 4 A-Plexine oder dem Plexin D1. Bindet dagegen Sema3C an Neuropilin 1 oder 2, so setzt nach derzeitigem Wissensstand Plexin D1 die intrazelluläre Reaktion in Gang (Kruger et al., 2005; Negishi et al., 2005; Suto et al., 2003; Yaron et al., 2005).

### **Co-Rezeptoren der Plexine und Neuropiline**

Eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen bilden mit den Plexinen und Neuropilinen funktionelle Rezeptorkomplexe für Semaphorine. So z.B. ist L1, ein Zelladhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie, Bestandteil des Rezeptorkomplexes für Sema3A und Sema3D. L1-defiziente Axone zeigen auf Sema3A keine Reaktion (Castellani, 2002; Wolman et al., 2007). NCAM, ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül, ist ein weiterer möglicher Assoziationspartner für die Neuropiline. NCAM ist beispielsweise Bestandteil des Rezeptorkomplexes für Sema3B und Sema3F (Falk et al., 2005). Dass Semaphorine auch als immunregulatorische Moleküle wirken können, zeigt dass Sema4D an CD72, einem Lymphozyten-Rezeptor auf B-Zellen, bindet (Elhabazi et al., 2003; Kumanogoh und Kikutani, 2003; Kumanogoh et al., 2000). Eine Assoziation von B-Plexinen mit der Rezeptortyrosinkinase Met wurde u.a. für Sema4D und Sema5A beschrieben (Artigiani et al., 2004; Giordano et al., 2002). Neben den Rezeptortyrosinkinasen kann auch OTK (Off-Track) mit den Plexinen funktionelle Semaphorin-Rezeptoren bilden. OTK gehört zu den Neurotrophin-Rezeptoren und fungiert in *Drosophila* als Co-Rezeptor für Sema1a (Winberg et al., 2001).

## **1.5.3. Funktionelle Rolle von Klasse-3-Semaphorinen während der Entwicklung des Nervensystems**

### **Axonale Repulsion und Attraktion**

Neben der Funktion im sich entwickelndem Nervensystem sind die Semaphorine außerdem in verschiedene biologische Prozesse involviert. Diese Prozesse umfassen z.B. immunregulatorische Funktionen (Spriggs, 1999; Takegahara et al., 2005), die Tumorgenese (Brambilla et al., 2000; Christensen et al., 1998; Yamada et al., 1997) sowie die Vaskularisierung (Gitler et al., 2004; Gu et al., 2005). Dennoch betreffen die meisten Studien die Funktionen der Semaphorine im Nervensystem, wobei Sema3A das am besten untersuchte Klasse 3-Semaphorin ist. Die Arbeitsgruppe um J. A. Raper isolierte mit Sema3A das erste Vertebraten-Semaphorin, und zeigte in einem *in vitro*-Experiment, dass Wachstumskegel von kultivierten Spinalganglien des Hühnchens nach Zugabe von Sema3A

kollabierten. Damit war eine repulsive Wirkung des Sema3A nachgewiesen (Luo et al., 1993). Danach folgten eine Reihe von verschiedenen Studien, die die Effekte von Sema3A auf verschiedenartige Axone untersuchten. Sema3A kann demnach als universeller repulsiver Faktor eingestuft werden, da er entweder eine Repulsion oder einen Wachstumskegellkollaps von motorischen (Varela-Echavarria et al., 1997), sensorischen (Kobayashi et al., 1997; Messersmith et al., 1995), hippocampalen (Chedotal et al., 1998; Steup et al., 1999) sowie cortikalen Axonen (Bagnard et al., 1998; Bagnard et al., 2000) induziert. Die Fähigkeit von Sema3A als repulsiver Faktor *in vitro* Axone abzustoßen, lässt auf dessen mögliche Funktionen *in vivo* schließen. So hindern die repulsiven Eigenschaften des Sema3A Axone am Eintritt in Nicht-Zielgebiete (Messersmith et al., 1995; Püschel et al., 1995; Renzi et al., 2000).

Um die Funktionen der Semaphorine während der Entwicklung eingehender zu untersuchen, wurden Sema3A <sup>-/-</sup> Mäuse generiert (Behar et al., 1996; Taniguchi et al., 1997). Da diese Mausmutanten aber bereits kurz nach der Geburt sterben, beschränkte sich deren Analyse bisher auf embryonale und neonatale Stadien. Sema3A <sup>-/-</sup> Mäuse zeigen Abnormalitäten in der Entwicklung des Skelettsystems sowie des Herzens. Im peripheren Nervensystem waren sensorische Axone stark defaszikuliert, demnach scheint Sema3A auch für die Faszikulierung von Axonen verantwortlich zu sein. Größere Defekte des Zentralnervensystems der Mausmutanten blieben aus. So zeigen nur die Neuriten der cortikalen Pyramidenzellen, die sich normalerweise zur VZ des Cortex orientieren (Polleux et al., 1998), eine abnormale Orientierung.

Neben repulsiven Effekten auf Axone vermitteln die Klasse-3-Semaphorine aber auch attraktive Effekte. So wirkt z.B. Sema3B attraktiv auf olfaktorische Axone (de Castro et al., 1999). Wird Sema3F als diffusibler Gradient in der Nähe von Körnerzellen des Cerebellums appliziert, so wachsen die Wachstumskegel in die Richtung der Sema3F-Quelle (Ding et al., 2007). Ein attraktiver Faktor für cortikale Axone stellt dagegen Sema3C dar (Bagnard et al., 2001; Bagnard et al., 1998). Die wenigen Beispiele für attraktive Effekte der Klasse-3-Semaphorine, lassen darauf schließen, dass weitaus mehr repulsive als attraktive Effekte auf Axone durch diese Semaphorine vermittelt werden.

### **Effekte auf Dendriten und Bifunktionalität der Semaphorine**

Neben der axonalen Lenkung, beeinflussen die Klasse-3-Semaphorine aber auch das Wachstumsverhalten der Dendriten. Die Arbeitsgruppe von A. Ghosh zeigte *in vitro* mit der „slice overlay“-Technik, dass Sema3A chemoattraktiv auf cortikale apikale Dendriten wirkt (Polleux et al., 1998; Polleux et al., 2000). Eine weitere Studie umfasste die detaillierte Analyse der cortikalen Dendriten einer Sema3A <sup>-/-</sup> Maus. In Abwesenheit von Sema3A reduzierte sich sowohl die Länge der Dendriten als auch deren Verzweigungsgrad. Nach

Zugabe von exogenen Sema3A erhöhte sich die dendritische Länge, auch die Anzahl der Verzweigungen nahm zu (Fenstermaker et al., 2004).

Betrachtet man nun die repulsiven bzw. die attraktiven Effekte von Sema3A auf Axone bzw. Dendriten, so wird deutlich das Sema3A, wie viele andere Lenkungsmoleküle auch, bifunktional wirkt. Die Bifunktionalität der Semaphorine kann im Zusammenhang mit der Konzentration des zyklischen Nukleotides Guanosin-3',5'-Monophosphat (cGMP) stehen, (Song und Poo, 1999). Ein auswachsender Neurit reagiert auf das gleiche Semaphorin je nach intrazellulärer Konzentration des cGMP attraktiv oder repulsiv. So bewirkt z.B. ein Sema3A-Gradient bei geringer cGMP-Konzentration eine Repulsion auf auswachsende sensorische Neuriten vom Krallenfrosch. Bei exogener Zugabe eines cGMP-Agonisten reagieren die sensorischen Neuriten dagegen attraktiv auf den Semaphorin-Gradienten (Song et al., 1998). Dieses Umschalten zwischen Repulsion und Attraktion, und auch umgekehrt, durch Veränderung der intrazellulären Konzentration der zyklischen Nukleotide konnte bereits auch bei anderen Lenkungsmolekülen beobachtet werden. Zudem ist es möglich die intrazelluläre Konzentration von den Nukleotiden durch verschiedene extrazelluläre Liganden, wie z.B. Zelladhäsionsmoleküle zu verändern (Höpker et al., 1999; Song et al., 1998; Song et al., 1997). Ein Beispiel dafür wäre die durch lösliches L1 hervorgerufene Konversion des chemorepulsiven Effektes von Sema3A in eine Attraktion (Castellani et al., 2000).

## Neuronale Migration

Während der neuronalen Migration wandern neuronale Zellen u.a. aus den proliferativen Zonen des Thalamus, der ganglionischen Eminenzen und des Cortex zu ihren eigentlichen Zielgebieten. Verschiedene Studien zeigten die Beteiligung der Klasse-3-Semaphorine an der radialen und tangentialen Migration von Neuronen. So war es z.B. lange unklar, ob ein Signal existiert, dass die radiale Migration der Neuronen in Richtung der superfiziellen Schichten des Cortex steuert. Eine aktuelle Veröffentlichung stellt mit Hilfe von verschiedenen *in-vitro*-Experimenten dar, dass Sema3A ein attraktives Lenkungssignal für radial migrierende cortikale Neurone ist. Dabei ist Sema3A in einem Gradienten über die corticalen Schichten, mit der höchsten Konzentration in oberen Schichten, exprimiert. Migrierende Neurone verfügen außerdem über den Neuropilin-1-Rezeptor. Bei Ausschaltung des Neuropilin-1-Rezeptors durch siRNA (kleine inhibierende RNA) wurde die radiale Migration so gestört, dass in postnatalen Stadien die meisten Neurone die oberen corticalen Schichten nicht erreicht haben (Chen et al., 2008). Lösliche Semaphorine der Klasse 3 beeinflussen neben der radialen Migration der corticalen Neurone auch die tangentielle Migration der corticalen und striatalen Interneurone (Marin et al., 2001; Tamamaki et al., 2003). Dabei migrieren cortikale und striatale Interneurone aus der medialen ganglionischen



Eminenz (MGE) im basalen Telencephalon in den Cortex oder das Striatum. Während der Migration der Interneurone (E12-E16) werden Sema3A und Sema3F im Striatum exprimiert. Cortikale Interneurone meiden das Striatum, da sie über Neuropilin 1 und 2 verfügen, und so die repulsiven Eigenschaften von Sema3A und Sema3F aus dem Striatum erfahren. Striatale Interneurone exprimieren weder Neuropilin 1 noch Neuropilin 2, und wachsen so ungehindert in das Striatum ein. Dies ist außerdem ein weiteres Beispiel dafür, dass sezernierte Semaphorine Nicht-Zielzellen in die richtige Bahn lenken.

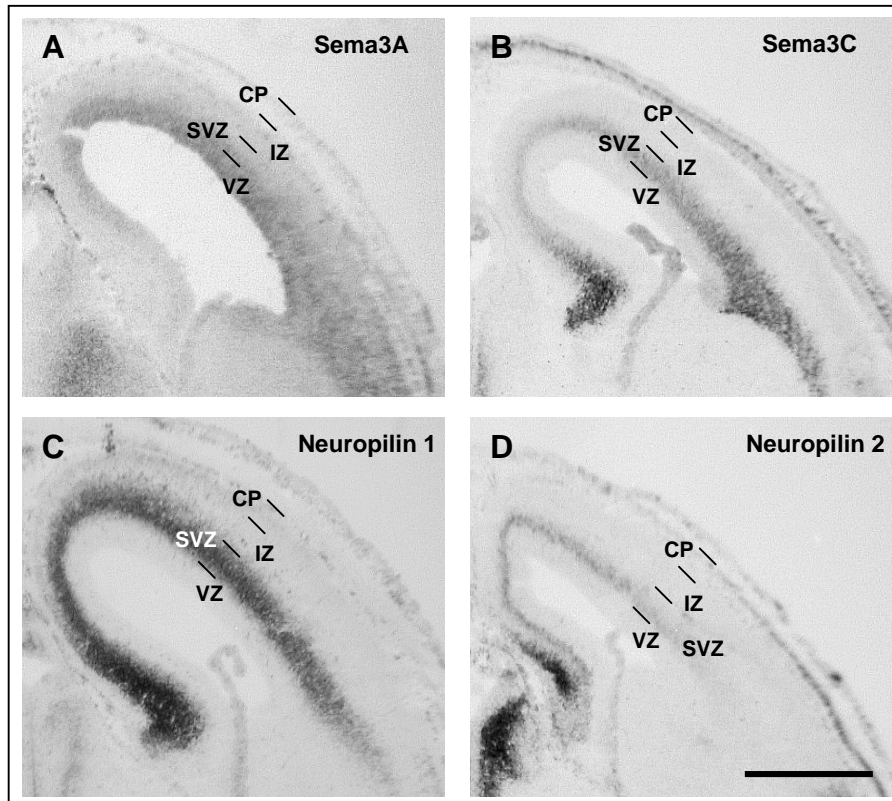
#### **1.5.4. Expression von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C sowie deren Neuropilin-Rezeptoren im embryonalen Cortex**

Eine Vielzahl von Studien belegen mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierung das Vorhandensein von Semaphorinen im embryonalen sowie im postnatalen Säugergehirn (Bagnard et al., 1998; Bürger, 2007; Skaliya et al., 1998). Da in der vorliegenden Arbeit vornehmlich der Einfluss von Semaphorin 3A und 3C auf embryonale cortikale Axone untersucht wurde, soll an dieser Stelle das Expressionsmuster von Semaphorin 3A und 3C sowie den Neuropilin-Rezeptoren im embryonalen Cortex am Tag 16 (E16) näher erläutert werden (Abb. 1.4).

Dabei weist der E16-Cortex noch nicht den für einen adulten Cortex typischen 6-schichtigen Aufbau auf, besteht aber aus verschiedenen Schichten bzw. Zonen (Vergleich Abb. 3.3, Material und Methoden). Die direkte Lage zu den lateralen Ventrikeln ist namensgebend für die erste Schicht, die Ventrikularzone (VZ). Basal darauffolgend befindet sich die Subventrikularzone (SVZ), die in eine obere und untere SVZ eingeteilt werden kann. Die in der Mitte des E16-Cortex gelegene Schicht heißt Intermediärzone (IZ), in ihr verlaufen u.a. afferente und efferente Fasern. Ab E14 geht aus der sogenannten Präplatte (PP), die Subplatte (SP) und die Marginalzone (MZ) hervor, dazwischen bildet sich die cortikale Platte (CP) aus. Die Marginalzone entspricht der späteren Schicht 1. Innerhalb der CP entstehen durch fortschreitende Invasion von postmitotischen Zellen ab dem 18. Embryonaltag die Schichten 6 bis 2 des Neocortex (Bayer und Altman, 1991).

Im E16-Cortex konnte Sema3A-mRNA in der VZ und der SVZ, sowie in der MZ nachgewiesen werden. In der VZ verläuft die Sema3A-Expression in einem Gradienten, der von medial nach lateral zunimmt (Bürger, 2007). Verschiedene Studien belegen zudem eine starke Expression von Sema3A in den höheren Schichten des Cortex bzw. in der MZ (Chen et al., 2008; Polleux et al., 1998; Polleux et al., 2000). Im Gegensatz zum Sema3A, was in verschiedenen Zonen des embryonalen Cortex exprimiert wird, wurde Sema3C-mRNA nur in der SVZ nachgewiesen (Bagnard et al., 1998; Bürger, 2007). Neben Sema3C wird in der kompletten SVZ außerdem Neuropilin 1 exprimiert. Zusätzlich ist eine Neuropilin-1-Expression in der IZ des dorsalen Abschnittes des Cortex zu beobachten (Bagnard et al.,

1998; Bürger, 2007). Eine Neuropilin-2-Expression ist dagegen in der MZ und in der unteren SVZ zu finden. Neuropilin 2 wird in der unteren SVZ zudem von medial nach lateral graduell exprimiert, wobei die höchste Konzentration medial zu beobachten ist (Bürger, 2007).



**Abb.1.4: Cortikale Expressionsmuster von Sema3A, Sema3C, Neuropilin 1 und Neuropilin 2 im Embryonalstadium 16.** Die *in-situ*-Hybridisierungen wurden an coronalen Kryostatschnitten des Telencephalons der Maus durchgeführt. Dargestellt ist die linke Hemisphäre des dorsalen Telencephalons. VZ = Ventrikularzone, SVZ = Subventrikularzone, IZ = Intermediärzone, CP = cortikale Platte. Die äußerste Schicht der CP entspricht der Marginalzone (MZ). Balken: 500  $\mu$ m. Die *in-situ*-Hybridisierungen wurden von Dipl.-Biologin Susanne Bürger durchgeführt, sie stellte zudem freundlicherweise die Fotografien zur Verfügung.

## 2. Zielstellung

---

Die Semaphorine beeinflussen auf vielfältige Weise die Lenkung von auswachsenden Axonen während der embryonalen Gehirnentwicklung. Sie zählen damit neben den Ephrinen und Netrinen zu den prominentesten axonalen Lenkungsmolekülen. Die Arbeitsgruppe Bolz konnte im kortikalen System den Klasse-3-Semaphorinen in vorangegangenen *in-vitro*-Experimenten repulsive als auch attraktive Eigenschaften zuschreiben (Bagnard et al., 1998; Bagnard et al., 2000).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Effekte von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf auswachsende cortikale Axone zu analysieren. Dazu wurden die *in-vitro*-Experimente Co-Kultur, Streifenassay und Membrangradienten so gewählt, dass sowohl der Einfluss von diffusiblen, als auch von membrangebundenen Sema3A und Sema3C auf cortikale Fasern getestet werden konnte. Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Wirkung hat diffusibles als auch membrangebundenes Sema3A auf das Wachstumsverhalten von embryonalen cortikalen Axonen?
- Wie reagieren dagegen cortikale Axone in Gegenwart von Sema3C? Wie wirkt sich die Blockierung der Sema3C-Bindungsstelle am Semaphorin-Rezeptor auf den attraktiven Effekt von Sema3C aus?
- Wie verhalten sich cortikale Axone in diffusiblen und membrangebundenen Sema3A- und Sema3C-Gradienten? Welche Unterschiede bestehen im Wachstumsverhalten in zunehmenden und abnehmenden Gradienten?
- Haben Sema3A und Sema3C einen Einfluss auf die Ausbildung der neuronalen Polarität?
- Was bewirkt der kombinierte Einfluss von Sema3A und Sema3C auf die cortikale Axonlenkung?

## **3. Material und Methoden**

---

### **3.1. Material**

#### **3.1.1. Versuchstiere**

Für alle durchgeführten Experimente wurden Mäuse des NOR-Stammes und EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)-exprimierende Mäuse (Okabe et al., 1997) des Stammes C57BL/6J verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum mit regelmäßigem Hell-Dunkel-Wechsel gehalten. Um die exakte Altersangabe der pränatalen Tiere zu gewährleisten, wurden die Elterntiere in den Stunden von 15.00 bis 7.00 Uhr verpaart, und danach getrennt gehalten. Der Tag nach der Paarungsnacht wurde als Embryonaltag 1 bezeichnet, darauffolgende Tage dementsprechend als E2 bis E21. Um eine mögliche Schwangerschaft festzustellen, wurden die weiblichen Mäuse in regelmäßigen Abständen gewogen. Eine Schwangerschaft war höchstwahrscheinlich, wenn z.B. am Embryonaltag 14 (E14) eine Gewichtserhöhung um 6 bis 10 g des Ausgangsgewichtes vorlag. Die Datierung des postnatalen Gewebes wurde durch den Tag der Geburt festgelegt, welcher als postnataler Tag 0 (P0) angegeben wurde, folgende Tage, äquivalent zu den Embryonaltagen, als P1 bis PN.

#### **3.1.2. Zelllinien**

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293- (human embryonic kidney 293) Zellen verwendet, die mit Expressionsvektoren für Semaphorin 3A (pBKSemD-AP) oder Semaphorin 3C (pBKSemE-AP) transfiziert waren (Bagnard et al., 1998). Fünf verschiedene Zelllinien kamen zur Anwendung: AP-3A; AP-3C; Sema3C\_3A; Sema3C\_3a als Semaphorin-exprimierende Zelllinien sowie HEK als Kontrollzelllinie. Die Semaphorin-Zelllinien waren mit einer Geneticin-Resistenz versehen, was eine Selektion der Semaphorin-exprimierenden Zellen ermöglichte. Um zu gewährleisten, dass die Semaphorinmoleküle in das Kulturmedium abgegeben wurden, waren diese an eine sezernierende Form der Alkalischen Phosphatase (AP) gekoppelt. Die Semaphorin-Zelllinien AP-3A; Sema3C\_3A und Sema3C\_3a wurden freundlicherweise von Prof. Andreas Püschel, die Zelllinie AP-3C von Dr. Dominique Bagnard zur Verfügung gestellt. Nach anfänglichen Experimenten und molekularbiologischer Überprüfung der verschiedenen Zelllinien, stellte sich heraus, dass die Zelllinien Sema3C\_3A und Sema3C\_3a Zellgemische darstellen. Bei gleichem Semaphorin 3C-Gehalt (ca. 70 % 3C) unterschieden sich die Gemische nur im

Semaphorin 3A-Gehalt: Sema3C\_3A (30 % 3A) und Sema3C\_3a (20 % 3A). AP-3A und AP-3C waren hingegen entsprechend ihrer Namensgebung reine Semaphorin-Zelllinien.

## **3.2. Zellbiologische Methoden**

Sämtliche Arbeitsschritte zur Aufbereitung von Gehirngewebe sowie die Arbeit mit den Zelllinien wurden unter sterilen Bedingungen in der sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Petrischalen und Reaktionsgefäße waren ebenso wie die benötigten Präparationsinstrumente steril, welche im Hot-bead-Sterilisator bei 250 °C für 10 s behandelt wurden. Alle Lösungen, die benutzt wurden, waren keimfrei.

Die Kultivierung der Zelllinien sowie des Gehirngewebes fand im Brutschrank unter humider Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil statt.

### **3.2.1. Umgang mit den Zelllinien**

#### **Lagerung der Zellen**

Die Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff bei ca. –195 °C in entsprechenden Kryoröhrchen gelagert.

#### **Auftauen von Zellen**

Die Zelllinien wurden aus dem flüssigem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden in 4 ml Zellkulturmedium gewaschen und bei RT und 800 U/min für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Petrischale mit 10 ml Medium überführt. Kultiviert wurden die verschiedenen Zelllinien bis zur Passage im Brutschrank.

#### **Passage der Zellen**

Nachdem das Zellkulturmedium verworfen und die Petrischale mit 1 ml warmen PBS gewaschen wurde, wurden die Zellen für maximal 5 min mit 1 ml 0,25 %-igem Trypsin behandelt. Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 3 ml Medium gestoppt. Nach Zentrifugation (800 U/min, 20 °C, 5 min) wurde das Pellet in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in die gewünschte Anzahl neuer Petrischalen mit jeweils 10 ml Medium überführt. Bei der Zellkultur mit Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-transfizierten Zellen wurde dem Zellkulturmedium 0,5 % Geneticin zugesetzt.

## **Einfrieren von Zellen**

Zur Bestandserhaltung wurden je nach Bedarf Zellen einer konfluent-bewachsenen Petrischale nach der normalen Passage eingefroren. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen wurden zunächst bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer Isopropanol-Kammer heruntergekühlt ( $1\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro min) und anschließend in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert.

### **3.2.2. Gewinnung von Membranen aus Zelllinien**

Vor der Verwendung der Zelllinien, wurde der Homogenisierungspuffer (H-Puffer) und das PBS mit Proteaseinhibitoren versetzt (Aprotinin-, Neuraminsäure-, Leupeptin- und Pepstatin A-Stammlösungen; 1:1000). Alle verwendeten Puffer und Lösungen waren auf Eis gekühlt.

#### **Aufreinigung der Zellmembranen**

Zur Herstellung von Membranen aus den Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-exprimierenden HEK-Zellen, sowie der Kontrollzelllinie wurden jeweils konfluent-bewachsene große Petrischalen (Durchmesser: 14 cm) verwendet. Dazu wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit 3 ml warmen PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in einem Volumen von 3 ml kalten PBS mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale abgeschabt und abzentrifugiert (800 U/min,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml H-Puffer resuspendiert und homogenisiert. Auf die Homogenisierung mit der 1 ml-Eppendorfspitze (ca. 20x triturieren) folgte die Gewebezerkleinerung mit der 200  $\mu\text{l}$ -Eppendorfspitze (ca. 20x triturieren). Nachdem das Homogenat ca. 15x mit der 1 ml-Einwegspritze (Kanüle: Gr. 20,  $0,40 \times 20\text{ mm}$ ) trituriert wurde, erfolgte eine Behandlung der Proben für 10 min im Ultraschallbad bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . In einem 12 ml-Ultrazentrifugenröhrchen wurden anschließend 5 ml der Zellsuspension auf einen Sucrosegradienten (1500  $\mu\text{l}$  5 % Sucrose auf 3500  $\mu\text{l}$  50 % Sucrose) geschichtet und ultrazentrifugiert (20.250 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 60 min). Pro Sucrosegradient konnten so die Zellmembranen von maximal 3 großen Petrischalen aufgereinigt werden. Durch die Ultrazentrifugation sammelt sich die Membranfraktion in der Interphase zwischen nieder- und hochprozentiger Sucroselösung an. Mit Hilfe einer 1 ml-Eppendorfspitze wurde die Membransuspension aus der Interphase entnommen, in PBS überführt und zentrifugiert (14.000 U/min,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min). Dieser Waschschriff wurde einmal wiederholt. Am Ende wurden die Pellets in 1050  $\mu\text{l}$  PBS vereint und wieder in Lösung gebracht. Im Anschluß an die Bestimmung der optischen Dichte der Membranlösung erfolgte das Einfrieren der Membranen (siehe 3.2.3.).

### 3.2.3. Gewinnung von Membranen aus Gehirngewebe

Für die Gewinnung von Membranen aus Gehirngewebe wurden postnatale Tiere des Alters P3 verwendet. Vor der Präparation des Cortexgewebes wurde der Homogenisierungspuffer (H-Puffer) und das PBS mit Proteaseinhibitoren versetzt (Aprotinin-, Neuraminsäure-, Leupeptin- und Pepstatin A-Stammlösungen; 1:1000). Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden während der Membranpräparation auf Eis gekühlt.

#### Entnahme von Gehirnen und Präparation der Cortices postnataler Tiere

Die P3-Tiere wurden durch Dekapitation mit einer Schere getötet. Zuerst erfolgte die Abtrennung der Kopfhaut. Durch einen rostralen Schnitt beginnend am Hinterhauptsloch wurde die noch weiche Schädeldecke mit einer feinen Schere entlang der Mittellinie geöffnet, und mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Auf das nun sichtbare Gehirn wurde etwas GBSS-Glukose-Lösung gegeben, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Anschließend erfolgte die Entfernung des Cortex von beiden Hemisphären. Dazu wurde senkrecht zur Gehirnoberfläche mit dem Skalpell ein Rechteck entsprechend des gesamten Cortexareals ausgeschnitten, aus dem umliegenden Gewebe herausgehoben und in GBSS-Glukose-Lösung überführt. Mit Hilfe des Skalpells konnte unter dem Stereomikroskop die dem Cortexgewebe anliegende weiße Substanz entfernt werden. Diese Gewebestücke wurden mit dem Tissue Chopper<sup>®</sup> auf 200 µm x 200 µm-Blöckchen gehackt, und mit einem angeschliffenen Spatel vom Tisch des Gewebehackers in H-Puffer überführt.

#### Aufreinigung der Zellmembranen

Die Homogenisierung des Gewebes von jeweils einem Tier erfolgte in einem mit 500 µl H-Puffer gefüllten Reaktionsgefäß durch mehrmaliges Triturieren. Die Gewebehomogenisierung wurde in folgender Reihenfolge durchgeführt: erstens mit der 1 ml-Eppendorfspitze (ca. 20x triturieren), zweitens mit der 200 µl-Eppendorfspitze (ca. 20x triturieren) und drittens mit der 1 ml-Einwegspritze (ca. 15x triturieren; Kanüle: Gr. 20, 0,40 x 20 mm). Anschließend wurden 500 µl der Gewebesuspension über einen Sucrosegradienten (150 µl 5 % Sucrose auf 350 µl 50 % Sucrose geschichtet und in der vorgekühlten Zentrifuge ultrazentrifugiert (50.000 U/min, 4°C, 10 min ). Da nach wurden die Zellmembranen mit der 1 ml-Einwegspritze aus der Interphase zwischen 5 %-iger und 50 %-iger Sucrose entnommen. Diese Membranfraktion wurde in 1 ml PBS überführt und zentrifugiert (14.000 U/min, 4°C, 10 min ). Nach der Resuspension des Pellets in PBS erfolgte eine weitere Zentrifugation (14.000 U/min, 4°C, 10 min). Wenn mehrere Tiere verwendet wurden, wurden die Pellets in 1050 µl PBS vereint und wieder in Lösung gebracht.

### **Bestimmung der optischen Dichte der Zellmembranen**

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Membransuspension wurde im Photospektrometer bei 220 nm in einer Quarzküvette durchgeführt. Für die OD-Wert-Bestimmung der Membranfraktion wurden 50 µl der Suspension mit 700 µl 2 % SDS gemischt. Der Leerwert setzt sich entsprechend aus 50 µl PBS und 700 µl 2 % SDS zusammen. Die so hergestellten Zellmembranen benötigten eine OD von 0,1. Frisch isolierte Membranen konnten als Suspension 4 bis 5 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne ihre Aktivität zu verlieren.

### **Einfrieren von Zellmembranen**

Dies erfordert eine OD von mindestens 0,2, da ein Teil der Membranen beim Auftau- und anschließenden Waschprozeß verloren geht. Zum Einfrieren der Zellmembranen bei –20 °C wurde eine nochmalige Zentrifugation (14.000 U/min, 4°C, 10 min) durchgeführt, und das Pellet in einem Volumen PBS/Glycerol-Lösung so resuspendiert, dass die optische Dichte im Meßansatz (50 µl Membransuspension und 700 µl SDS) 0,2 betragen hätte. Die Membranen konnten bei –20 °C bis zu 6 Monate gelagert werden.

### **3.2.4. Primärkultur: cortikale Einzelzellen und Explantate auf verschiedenen Substraten**

Zur Untersuchung des Einflusses von membrangebundenen Semaphorin auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Axonen, wurden cortikale Einzelzellen und Explantate auf verschiedenen semaphorinhaltigen Membranen kultiviert.

### **Vorbereitung eingefrorener Membranen für *in-vitro*-Experimente**

Für die verschiedenen *in-vitro*-Experimente wurden die Zellmembranen der Zelllinien (HEK, AP-3A, AP-3C, Sema3C\_3A und Sema3C\_3a), sowie die cortikalen postnatalen Membranen der Mäuse (P3) verwendet. Die benötigten Membranen wurden, nachdem sie einige Minuten bei Raumtemperatur gelagerten, bei 14.000 U/min 10 min in der vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Das PBS/Glycerol-Gemisch wurde durch die gleiche Menge PBS ersetzt und die Membranen resuspendiert. Anschließend wurde die Messung der optischen Dichte der Membransuspension, wie bereits beschrieben, vorgenommen. Die Einstellung des OD-Wertes der Membransuspension auf 0,1 erfolgte entweder durch Zugabe von PBS zu der Suspension oder durch erneute Zentrifugation (14.000 U/min, 4°C, 10 min) und Resuspension in einem entsprechend geringeren Volumen PBS. Um ein optimales Wachstum des cortikalen Gewebes im Streifenassay und den Streifengradienten zu gewährleisten, wurden die HEK- bzw. semaphorinhaltigen Membranen mit den cortikalen



postnatalen Membranen im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Das bedeutet, dass z.B. 400 µl HEK-Membransuspension mit 200 µl cortikalen postnatalen Membranen vermischt wurden. Die postnatalen Membranen erwiesen sich als ideales Wachstumssubstrat für cortikale Kulturen (Götz et al., 1992; Hübener et al., 1995). Ohne deren Zugabe erfolgte kein oder ein schlechtes Auswachsen der Kulturen. Während dieser verschiedenen Arbeitsschritte sollten die Membranen auf Eis gelagert werden. Nicht verwendete aufgetaute Membranen konnten weitere 4 bis 5 Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

### **Herstellung beschichteter Deckgläser**

Rechteckige Deckgläser (12 x 14 mm) oder runde Deckgläser (Durchmesser: 9mm) wurden in einem Halter separat eingespannt, durch Erhitzen bis 60 °C in absolutem Alkohol für 30 min entfettet, und nach Abdampfen des Alkohols für ca. drei Stunden bei 140 °C sterilisiert. Die Beschichtung der Deckgläser erfolgte mit einem Laminin-Poly-L-Lysin-Gemisch. Dazu wurden 19 µl Laminin-Lösung (1 mg/ml) und 1 µl Poly-L-Lysin-Lösung (10 mg/ml) in 980 µl GBSS gegeben. Diese Menge war ausreichend, um 20 Deckgläser zu beschichten. Jeweils 100 µl dieser Mischung wurden auf die Deckgläser gegeben. Die Deckgläser mit dem Laminin-Poly-L-Lysin-Gemisch wurden mit einem zweiten Deckglas bedeckt. Nach mindestens 30 min Inkubationszeit im Brutschrank erfolgte die Trennung der Sandwiches. Die einzelnen Deckgläser wurden anschließend mit Bidest. gewaschen und getrocknet.

### **Präparation von cortikalem Gewebe**

Zur Herstellung von cortikalen Explantatkulturen sowie cortikaler Einzelzellen wurden Mäuse des Embryontages 15 (E15) präpariert. Dafür wurde eine trächtige Maus durch intraperitoneale Injektion mit einer Überdosis Chloralhydrat (10 %, 1 ml) getötet. Nach der Benetzung der Bauchdecke mit 70 % Ethanol wurde diese geöffnet, die Embryonenketten entnommen und in eine Petrischale überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten nun unter sterilen Bedingungen in der Werkbank. Das Gehirngewebe wurde während der Präparation in eiskalter GBSS-Glukose-Lösung aufbewahrt. Nachdem die Fruchtblasen der Embryonenketten geöffnet waren, wurden die Köpfe der Embryonen abgetrennt. Zunächst wurden vorsichtig die Häute mit zwei Pinzetten entfernt. Anschließend wurden die zwei Hirnhemisphären vom Neuralrohr isoliert. Von einer Hirnhemisphäre wurden die beiden lateralen Enden durch Schnitt mit dem Skalpell entfernt. So konnte der gewölbte Cortex aufgeklappt werden. Für die Präparation der cortikalen Explantate und Einzelzellen wurde jeweils nur der mittlere Anteil des hochgeklappten Cortex verwendet. Dieser cortikale Anteil entsprach dem somatosensorischen Cortex bei E15. Die Dauer der Präparation des embryonalen Gewebes sollte 1 h nicht überschreiten.

**Cortikale Explantate:** Das cortikale Gewebe wurde in eiskalter GBSS-Glukose-Lösung gesammelt, und der embryonale Cortex mit dem Tissue Chopper® in 200 x 200 µm-Blöckchen gehackt. Die erhaltenen cortikalen Explantate wurden mit einem Spatel in 37 °C temperiertem methylzellulosehaltigen Kulturmedium aufgenommen und unter dem Stereomikroskop mit einer Pipette vereinzelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Explantate im Brutschrank für mindestens 2 h.

**Cortikale Einzelzellen:** Das cortikale Gewebe wurde in 5 ml eiskalter HBSS-Glukose-Lösung (Sammelmedium) gesammelt. Nach der Zugabe von 1 ml 0,25 %-igem Trypsin wurde das Gewebe im Wasserbad bei 37 °C für 17 min anverdaut. Zum Stoppen der Trypsinreaktion wurde das HBSS / Trypsin-Gemisch entfernt und 1 ml eiskaltes Kulturmedium für primäre cortikale Einzelzellen dazugegeben. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer abgerundeten Pasteurpipette wurde das anverdaute Gewebe homogenisiert. Eine Vereinzelung der Neurone wurde erzielt, indem die Gewebesuspension durch ein Netz (Maschenweite: 130 µm) filtriert wurde. Die Bestimmung der Anzahl der cortikalen Neurone erfolgte durch Auszählen in einer Neubauer-Kammer.

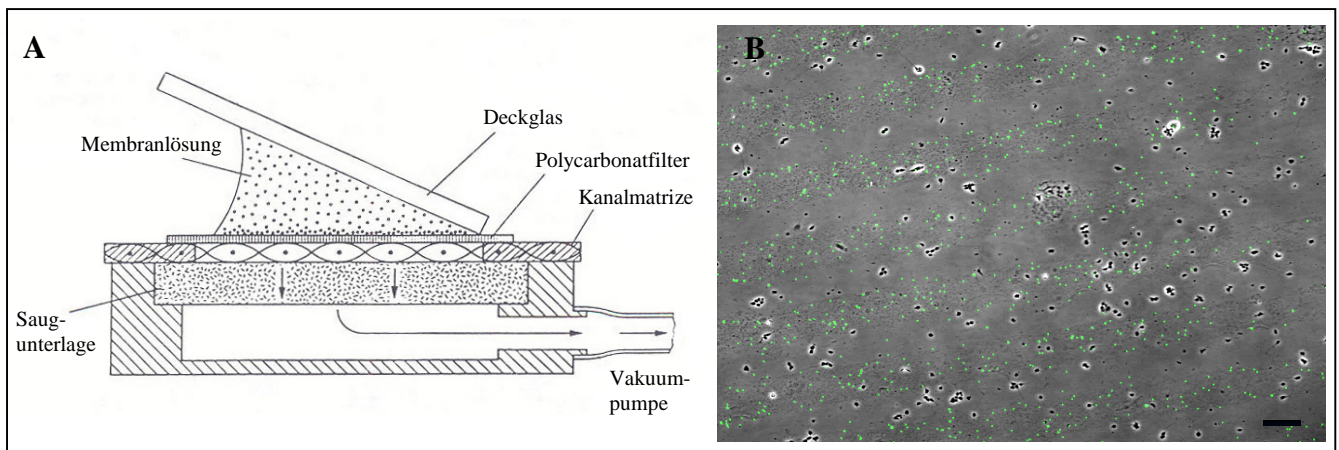
### **Streifenassay: Monostreifen**

Im sogenannten Streifenassay können zwei verschiedene Substrate als alternierende Streifen wachsenden Axonen angeboten werden, um deren Fähigkeit zu testen zwischen diesen Substraten unterscheiden zu können (Walter et al., 1987). Als Substrate dienten die Zellmembranen der verschiedenen Zelllinien (HEK, AP-3A, AP-3C, Sema3C\_3A und Sema3C\_3a) unter Zugabe der cortikalen postnatalen Membranen der Mäuse (P3). Zur Überprüfung des Streifenmusters wurden die Membranen mit fluoreszierenden Kügelchen versetzt und unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die verwendete Membranlösung hatte eine optische Dichte von 0,1. Zur Herstellung des Streifensubstrates wurde das entsprechende Membransubstrat in alternierenden Streifen mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf Polycarbonatmembranen gesaugt. Als Aufsatz diente dazu eine Kanalmatrize, deren horizontale Kanäle im Abstand von 90 µm zueinander lagen und 90 µm breit waren. Diese Monostreifen wurden später auf Laminin-Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser durch Druck transferiert. Somit wechselten sich auf dem Substrat Laminin-Poly-L-Lysin-Streifen mit Membranstreifen ab. Die Deckgläser wurden bis zu Ihrer Verwendung in PBS bei 4 °C für maximal 12 h aufbewahrt.

### **Streifengradienten**

Ein Streifengradient besteht, ähnlich wie ein Monostreifen, aus parallelen Membranstreifen, wobei aber jeder Streifen in longitudinaler Richtung einen Membrangradienten enthält (Abb.: 3.1 B). Die Herstellung von Streifengradienten entspricht in den wesentlichen Schritten der

Herstellung von Monostreifen. Auf die Kanalmatrize wurde die Polycarbonatmembran gelegt und die Membransuspension aufpipettiert. Ein Deckglas, gestützt durch eine Pinzette, wurde schräg an den Membrantropfen gelehnt, so dass die Membransuspension an das Deckglas adhärierte (Abb.: 3.1 A). Durch Anlegen eines Vakuums verschob sich der Meniskus der Membransuspension unter dem Deckglas langsam in eine Richtung. Die Membranpartikel positionierten sich als Gradient, wobei die höchste Membrankonzentration dort zu finden war, wo das Deckglas der Polycarbonatmembran am nächsten war. Hingegen, dort wo das Deckglas am weitesten von der Membran entfernt war, war eine niedrige Membrankonzentration zu verzeichnen. Auch die Streifengradienten auf den Polycarbonatmembranen wurden auf Laminin-Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser transferiert. Die Streifengradienten wurden bis zur Kultivierung mit cortikalem Gewebe in eiskaltem PBS aufbewahrt (maximal 12 h).

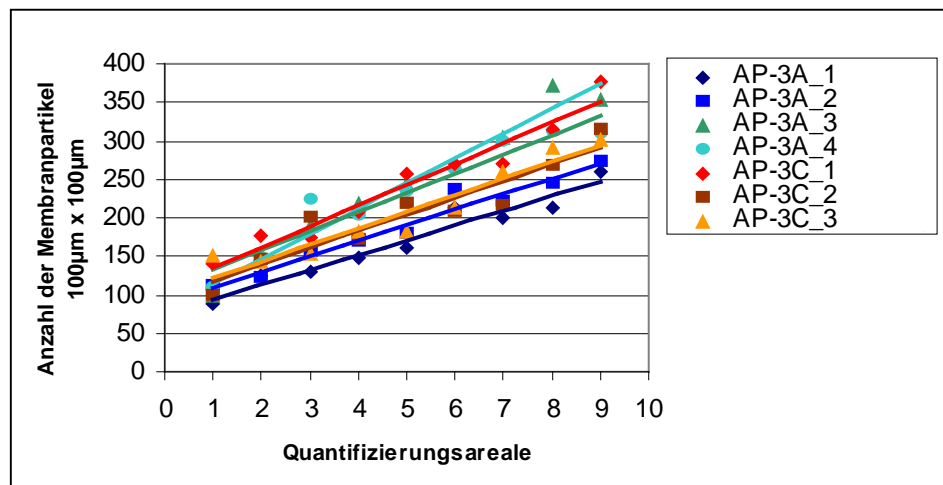


**Abb. 3.1: Herstellung von Streifengradienten.** **A):** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. (Abb. nach Baier und Klostermann, 1994) **B):** Fotografische Aufnahme eines Streifengradienten mit kultivierten corticalen Einzelzellen. Die Membranen wurden mit fluoreszierenden Kügelchen versetzt. Balken: 100 µm.

### Allgemeine Charakterisierung der Streifengradienten

Abb. 3.1 B zeigt einen Streifengradienten. Durch die den Membranen zugesetzten grün-fluoreszierenden Kügelchen sind die als Gradienten verlaufenden Membranstreifen gut sichtbar. Die genaue graduelle Verteilung der Membranen auf dem 9 mm langen Gradienten wurde durch Auszählen der Membranpartikel charakterisiert. Abb. 3.2 stellt die Vermessung der Membrangradienten anhand von einigen Beispielen grafisch dar. Entlang des Gradienten wurden dazu neun mal im Abstand von 1 mm auf einer Fläche von 100 µm mal 100 µm die Membranpartikel ausgezählt. Die Quantifizierung startete im Bereich mit der niedrigsten Membrankonzentration. Die in den verschiedenen Arealen erhaltene Membranpartikelanzahl wurde grafisch aufgetragen und die Regressionsgeraden berechnet. In Richtung steigender Membrankonzentration nahm die Anzahl der Membranpartikel linear zu. Die

Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden  $r$  lagen zwischen 0,93 und 0,99. So wurden z.B. beim AP-3A\_1-Gradienten im Bereich der niedrigsten Membrankonzentration 89 Partikel ausgezählt; im Bereich der höchsten Membrankonzentration waren es 260 Membranpartikel. Somit stieg die Partikelanzahl um einen Faktor von 2,9 an. Dies entsprach einer Steigung des Gradienten über die Gesamtlänge von 9000  $\mu\text{m}$  von 290 %. Betrachtet man hingegen einen einzelnen Wachstumskegel mit der Länge von 10  $\mu\text{m}$ , so ist dieser im Mittel einer Steigung des Gradienten von 0,29 % ausgesetzt. Die Steigungen der AP-3A- und AP-3C-Membrangradienten unterschieden sich kaum, sie lagen im Mittel bei 280 %.



**Abb. 3.2: Quantitative Analyse der Vermessung der Membrangradienten.**

Neun mal wurde auf den Gradienten mit einer Gesamtlänge von 9000  $\mu\text{m}$  die Membranpartikelanzahl auf einer Fläche von 10000  $\mu\text{m}^2$  beginnend mit der niedrigsten Membrankonzentration quantifiziert. Im Mittel stieg die Membranpartikelanzahl von der niedrigen zur höchsten Konzentration linear um einen Faktor von 2,8 an. Berechnet auf die Größe eines Wachstumskegels von 10  $\mu\text{m}$  betrug die Steigung durchschnittlich 0,28 %.

### Aufbringen der kortikalen Explantate auf die Substrate

Die Cortexblöckchen wurden auf Monostreifen explantiert. Die Deckgläser mit den entsprechenden Membransubstraten wurden paarweise in eine Petrischale (Durchmesser: 5,5 cm) gelegt und sofort mit 800  $\mu\text{l}$  Kulturmedium für primäre kortikale Explantate bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Die so behandelten Deckgläser wurden für 10 min in den Brutschrank gestellt. Durch Schwenken der Petrischale wurde eine homogene Verteilung des Mediums erreicht. Die in Suspension befindlichen kortikalen Explantate wurden aus dem Inkubator genommen und mit der 1 ml-Eppendorfspitze durch vorsichtiges Ein- und Ausaugen erneut vereinzelt. Sie wurden nun mit einer 20  $\mu\text{l}$ -Pipette aufgenommen und auf die mit Medium benetzten Deckgläser übertragen; ca. 30 – 40 vereinzelt Explantate pro Deckgläschen. Dabei waren zwei Dinge zu beachten. Erstens sollte das mit der Pipette erzeugte Flüssigkeitsvolumen möglichst gering sein, um ein „Schwimmen“ der Explantate zu vermeiden. Zweitens durfte das Gewebe während des Vorganges des Explantierens nicht

austrocknen. Nach ca. 10 min des Adhärrierens der Explantate im Brutschrank, wurde das Medium in der Petrischale vorsichtig auf 2 – 3 ml aufgefüllt. Die Kulturen wurden im Brutschrank für 2 Tage inkubiert und dann fixiert.

### **Aufbringen der kortikalen Einzelzellen auf die Substrate**

Cortikale Einzelzellen wurden ausschließlich auf Streifengradienten kultiviert. Die Deckgläser mit den Membrangradienten wurden dazu in 6-Well-Schalen gegeben und jeweils mit 1 ml Kulturmedium für primäre kortikale Einzelzellen bedeckt. Pro Well wurden 330.000 Zellen in das Kulturmedium gegeben und die Wellschale leicht geschwenkt, so dass sich die Zellen optimal verteilten. Nach ca. 30 min waren die Zellen auf den Deckgläsern adhärirt. Die kortikalen Neurone wurden auf den Streifengradienten 24 h im Brutschrank kultiviert.

### **3.2.5. Co-Kultur aus HEK-Zellaggregaten und kortikalen Explantaten**

Zur Analyse des Wachstumsverhaltens von kortikalen Axonen unter dem Einfluss von löslichem Semaphorin 3A und 3C, wurden die Semaphorin-sezernierenden Zelllinien mit kortikalen Explantaten in einem Plasmaclot co-kultiviert.

### **Herstellung der Zellaggregate**

Für die Gewinnung von Zellaggregaten der Zelllinien HEK, AP-3A, AP-3C, Sema3C-3A und Sema3C\_3a war eine normale Passage der konfluent-bewachsenen Petrischalen erforderlich (siehe Abschnitt 3.2.1.). Nach Trypsinreaktion und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 400 µl Zellkulturmedium resuspendiert. In den Boden einer Petrischale (Durchmesser: 5,5 cm) wurden 2 ml Zellkulturmedium gefüllt. Anschließend wurden in den Deckel der Petrischale 10 bis 12 Tropfen der Zellsuspension à 20 µl gesetzt. Der Deckel wurde vorsichtig herumgedreht und auf den Boden der Petrischale zurückgesetzt. Die Kultivierung der sogenannten „hängenden Tropfen“ erfolgte über Nacht im Brutschrank. Aufgrund der Schwerkraft sammelten sich die im Tropfen befindlichen Zellen im unteren Bereich des Tropfens und bildeten ein Zellaggregat.

Am nächsten Tag wurde der Deckel der Petrischale vorsichtig abgenommen und herumgedreht. Mit Hilfe eines abgeschliffenen Spatels wurden die Zellaggregate aus den Tropfen entfernt und bis zum weiteren Gebrauch in Zellkulturmedium überführt. Je nach Bedarf wurden die Zellaggregate mit Minutiennadeln geteilt oder geviertelt.

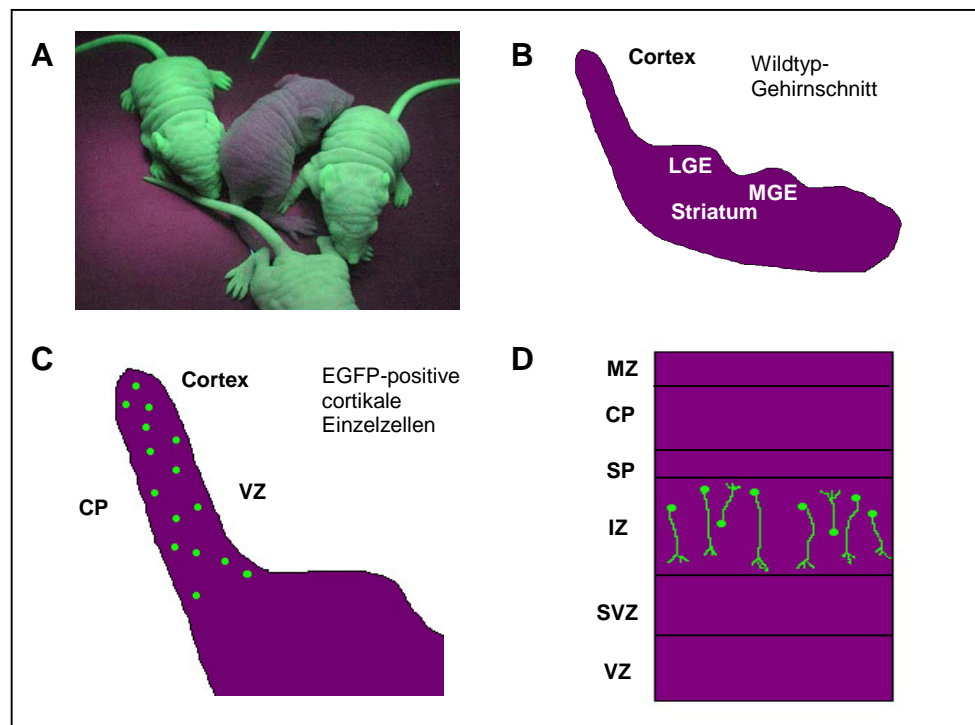
## Co-Kultur

Die kortikalen Explantate wurden wie im Abschnitt 3.2.4. beschrieben präpariert. In Petrischalen (Durchmesser: 3,5 cm) wurde jeweils ein unbeschichtetes rechteckiges Deckglas gelegt. Auf das Deckglas wurde ein Tropfen Huhnplasma à 20 µl pipettiert. Mit Hilfe eines Spatels wurde dann ein Zellaggregat aus dem Zellkulturmedium in das Huhnplasma transferiert. Ca. zehn kortikale Explantate wurden mit einer 20 µl-Pipette aufgenommen und ebenfalls in den Tropfen Plasma überführt. Mit Minutiennadeln wurden die Explantate um das Aggregat angeordnet. Der Abstand der Explantate untereinander sowie zum Zellaggregat sollte dabei ungefähr 1 mm betragen. Auf den Plasmotropfen, indem sich das Zellaggregat und die Explantate befanden, wurden anschließend 25 µl von dem GBSS / Thrombin-Gemisch gegeben. Die Positionen der Explantate zum Zellaggregat wurden mit Minutiennadeln erneut korrigiert. Nach 45 min Inkubationszeit im Brutschrank wurden 2,5 ml Kulturmedium für primäre kortikale Explantate dazugegeben. Einem Teil der Co-Kulturen wurde ein funktionell blockierender Antikörper gegen Neuropilin-2 zugesetzt (2,5 µl anti-npn2 pro 1 ml Medium). Die Co-Kulturen wurden für zwei Tage im Brutschrank belassen, danach mit 4 % PFA/PBS fixiert und mit Mowiol eingedeckelt.

### 3.2.6. Primärkultur: Darstellung kortikaler EGFP-Neurone auf coronalen Schnitten

Es fanden EGFP-exprimierende Mäuse des Stammes C57BL/6J am Embryonaltag 16 Anwendung. Dazu wurden Wildtyp-Weibchen mit EGFP-heterozygoten Männchen oder umgekehrt verpaart, wodurch EGFP-heterozygote als auch Wildtyp-Nachkommen entstanden (Abb.: 3.3 A). Die Köpfe der Embryonen wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop in Wildtyp und EGFP-Tiere separiert. Die Gehirne wurden jeweils herauspräpariert. Die Wildtyp-Gehirne dienten zur Herstellung der coronalen Gehirnschnitte; aus den EGFP-Gehirnen wurden, wie im Abschnitt 3.2.4. beschrieben, kortikale Einzelzellen präpariert (Abb.: 3.3 B). Die Wildtyp-Gehirne wurden mit dem Tissue Chopper® coronal in 250 µm breite Schnitte gehackt. Die Schnitte wurden auf runde Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläser transferiert, die sich in einer Petrischale (Durchmesser: 3,5 cm) mit 1 ml Kulturmedium für coronale Schnitte befanden. Nachdem die Gehirnschnitte auf den Deckgläsern positioniert wurden, wurden der Petrischale 200 µl Medium entnommen und 200.000 EGFP-positive kortikale Einzelzellen auf den Schnitt gegeben (Abb.: 3.3 C) und D). Für die Dauer des Adhärerens der kortikalen Zellen auf den Gehirnschnitten (ca. 45 min), wurden die Petrischalen im Brutschrank aufbewahrt. Danach wurden weitere 350 µl Medium entfernt, so dass das Endvolumen 450 µl in der Petrischale betrug. Bei Verwendung des funktionell blockierenden Antikörpers gegen Neuropilin-2, wurden 2,5 µl anti-npn2 pro 1 ml

Medium zugesetzt. Die Schnitte wurden für 2 Tage im Brutschrank kultiviert, wobei nach 1 Tag *in vitro* ein Mediumwechsel erfolgte; 100 µl Medium wurden durch 150 µl frisches Medium ersetzt. Am 2. Tag *in vitro* wurden die Kulturen mit 4 % PFA / PBS fixiert.



**Abb. 3.3: Schematische Darstellung der Kultivierung von EGFP-Neuronen auf Wildtyp-Gehirnschnitten.** **A):** Nachkommen einer heterozygoten EGFP-Maus, die mit einer Wildtyp-Maus verpaart wurde (Foto: M. Okabe, 1997). **B):** Schematische Darstellung eines Wildtyp-Gehirnschnitts. **C) und D):** Kultivierung der EGFP-positiven corticalen Zellen auf Schnitten des somatosensorischen Cortex. LGE = laterale ganglionische Eminenz, MGE = mediale ganglionische Eminenz, MZ = Marginalzone, CP = corticale Platte, SP = Subplatte, IZ = Intermediärzone, SVZ = Subventrikularzone, VZ = Ventrikularzone.

### 3.3. Immunhistochemie an corticalen Explantaten und Einzelzellen

Die mit PFA-Lösung fixierten Explantat- und Einzelzellkulturen wurden zur immunhistochemischen Markierung der Axone genutzt. Nach Entfernung der Fixierlösung wurden die Deckgläser drei mal 15 min in Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Kulturen für 30 min in der Blockierungslösung inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde erneut ein dreimaliger Waschgang von jeweils 15 min durchgeführt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT. Der Antikörper wurde in entsprechender Konzentration in der Blockierungslösung verdünnt. Danach folgte auf einen weiteren dreimaligen Waschgang von jeweils 15 min in Waschpuffer die Inkubation der Deckgläser mit dem Sekundärantikörper, welcher, wie der primäre Antikörper, in der Blockierungslösung in entsprechender

Verdünnung angesetzt wurde. Nach Inkubation der Deckgläser mit dem sekundären Antikörper für 45 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln, schloss sich ein letzter Waschgang von drei mal 15 min mit Waschpuffer mit 0,05 mg/ml DAPI an. Die Deckgläser wurden auf Objektträger (MENZEL-GLÄSER) mit Mowiol eingebettet und bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.4. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.4.1. Besonderheiten im Umgang mit RNA: Arbeiten unter Ribonuklease (RNase)-freien Bedingungen**

Um einer Degradation der RNA (Ribonukleinsäure)-Moleküle durch Ribonukleasen vorzubeugen, erfordert die Arbeit mit RNA gesonderte Bedingungen. Unabdingbar sind dabei RNase-freie Arbeitsplätze sowie das Tragen von Handschuhen. Die Arbeitsplätze sowie die Handschuhe wurden dazu mit RNase away (Molecular Bio Products) abgewischt. Sämtliche hitzestabile Geräte aus Metall und Glas wurden für 3 h im Trockenschrank auf 180 °C erhitzt. Es wurden gesonderte Chemikalien sowie RNase-freie Einwegmaterialien verwendet. Flüssige Lösungen wurden durch eine Behandlung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) RNase-frei. Dazu wurde der Lösung 1/1000 ihres Volumens DEPC zugesetzt; anschließend wurde autoklaviert (20 min, 121 °C bei 2 bar).

#### **3.4.2. RT-PCR zum Nachweis der Semaphorin 3A und Semaphorin 3C Expression in HEK-Zellen**

##### **Präparation totaler RNA**

Konfluent-bewachsene Petrischalen von den Zelllinien HEK, AP-3A, AP-3C, Sema3C\_3A und Sema3C\_3a wurden wie bereits im Abschnitt 3.2.1. beschrieben, geerntet. Zur Isolierung der totalen RNA wurde das Pellet in 3 ml Trizol<sup>®</sup> resuspendiert und mit einer Kanüle (Kanüle: Gr. 1, 0,90 x 40 mm) homogenisiert. Trizol<sup>®</sup> besteht aus einer Phenol- und Guanidin-Isothiocyanat-Lösung und bewirkt effektiv die Denaturierung der Proteine. Nach der Homogenisierung wurden einem Trizol-Volumen von 800 µl 160 µl Chloroform zugegeben und durch Invertieren des Epis gut durchmischt. Dadurch kommt es zur Phasentrennung. Um die Phasen optimal voneinander zu trennen, wurde das Trizol<sup>®</sup> / Chloroform-Gemisch in ein Reaktionsgefäß mit Phase Lock Gel<sup>®</sup> (Eppendorf) gegeben. Durch Zentrifugation (14.000 g, 12°C, 15 min) trennten sich die Phasen in eine obere wässrige und eine organische Phase; das Gel fungierte dabei als Barriere zwischen den Phasen. Die wässrige Phase enthielt die gewünschte RNA und wurde zur Aufreinigung



weiter verwendet. Zur wässrigen Phase wurden 200 µl absoluter Ethanol hinzugefügt und gut durchmischt. Die RNA-Säulen (RNeasy Microkit, Quiagen) wurden mit dem Gemisch beladen und bei RT zentrifugiert (8000 g, 15 s). Im Anschluß wurde mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen. Der Durchfluß wurde jeweils verworfen; die RNA hingegen war an die Säule gebunden. Für die Degradation von Resten genomischer DNA (Desoxyribonukleinsäure) wurde zusätzlich eine Behandlung der Proben mit Desoxyribonuklease I (RNase-Free DNase Set, Qiagen) entsprechend beiliegendem Protokoll durchgeführt. Es folgten drei Waschschrte mit 350 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer bei 8000 g für 15 s und mit 500 µl 70 % -igem Ethanol bei 8000 g für 2 min. Die Säulen wurden für 5 min bei 15.000 g trocken zentrifugiert. Für die Elution der RNA von der Säule wurden 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> auf die Säule gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Durch eine abschließende Zentrifugation (15.000 g, RT, 1 min) wurde die RNA gewonnen. Mit dem UV-Spektrometer wurden Konzentration und Reinheit der Proben über die optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die RNA-Proben wurden am gleichen Tag weiter verwendet oder dauerhaft bei -80 °C eingefroren.

### **Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Bei der Reversen Transkription wird RNA mit Hilfe von Enzymen (reverse Transkriptasen) in cDNA umgeschrieben. Die dafür notwendigen Primer für Semaphorin 3A und Semaphorin 3C wurden von Diplom-Biochemiker Philipp Kaiser entwickelt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Es wurde genspezifisch für Semaphorin 3A und -3C die RNA revers transkribiert. Um 3 µg RNA in cDNA umzuschreiben, wurde die RNA-Probe zunächst mit 200 ng 3'-Primer für Semaphorin 3A und -3C in einem Volumen von 11 µl für 5 min bei 70 °C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Danach wurden dem Ansatz 4 µl Reaktionspuffer der reversen Transkriptase, 2 µl Desoxynukleotide sowie 0,5 µl Ribonuklease-Inhibitor (20 U) dazu gegeben. H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> ergänzte das Ansatzvolumen von 19 µl. Die Proben wurden 5 min bei 37 °C inkubiert, um ein Anlagern der Primer zu ermöglichen. Anschließend wurde 1 µl reverse Transkriptase (200 U) zum Ansatz gegeben und bei 42 °C für 1 h inkubiert. Nach der einstündigen Reaktionsdauer wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert.

## Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich kleinste Mengen an DNA vervielfältigen. Sie beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten: erstens die Trennung der beiden Stränge der DNA durch Denaturierung, dem anschließenden Hybridisieren der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt und der enzymatischen Verlängerung der gebundenen Primer durch eine DNA-Polymerase. So entstehen nach 20 Zyklen aus einem DNA-Molekül über eine Million Moleküle.

Ca. 4 ng der aus den verschiedenen Zelllinien synthetisierten cDNA wurden für die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte verwendet.

Der PCR-Reaktionsansatz von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	Reaktionspuffer der DNA-Polymerase
5 µl	Q-Solution
1,5 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,2 µl	5'-Primer (20 pMol)
0,2 µl	3'-Primer (20 pMol)
0,2 µl	Desoxynukleotide
0,25 µl	HotStart DNA-Polymerase
0,5 µl	cDNA-Probe

H<sub>2</sub>O ergänzte das Ansatzvolumen von 25 µl.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

1. Aktivierung der DNA-Polymerase	95 °C	2 m in	
2. Denaturierung	95 °C	45 s	
3. Annealing	59 °C bzw. 60 °C	45 s	
4. Elongation	72 °C	1 min	2. bis 4.: 4 Zyklen
5. Denaturierung	95 °C	45 s	
6. Annealing	65 °C	45 s	
7. Elongation	72 °C	1 min	5. bis 7.: 24 Zyklen
8. Hold	4 °C.		

Die Einstellungen beim Annealing wurden für jedes Primerpaar optimiert (Primer 3A: 60 °C und Primer 3C: 59 °C). Die Temperatur wurde zusätzlich um 0,8 °C pro Zyklus gesenkt; dies verhinderte die Bildung unspezifischer Produkte. Zu jeder PCR wurden zusätzlich von Philipp Kaiser zur Verfügung gestellte Positivkontrollen mitgeführt. Es handelte sich hierbei um

cDNA-Proben aus dem Thalamus embryonaler Mäuse am Tag 15 (E15), die sicher Semaphorin 3A- und Semaphorin-3C-cDNA enthielten. Das Ergebnis der PCR wurde mit einem 1 %-igem Agarose-Gel überprüft. Als Laufpuffer diente TBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA) in einer horizontalen Gelkammer bei einer Feldstärke von 4 bis 6 V/cm. Vor dem Auftragen der Proben, wurden diese mit 1/9 ihres Volumens 10x Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau in 40 % Glycerol v/v) versetzt. Um die Proben zu quantifizieren, wurde zusätzlich eine 1 kb Plus DNA Leiter aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zum Anfärben der DNA in ein Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml H<sub>2</sub>O) gelegt und geschwenkt. Abschließend wurde das Gel in TBE-Puffer 15 min entfärbt und in einem Gel-Dokumentationssystem fotografiert.

### **Reinigung des PCR-Produktes**

Für die Aufreinigung der durch PCR amplifizierten DNA wurde der „QIAquick PCR Purification Kit“ von Qiagen verwendet. 20 µl PCR-Produkt wurden mit 100 µl PBI-Puffer gemischt und auf die zum Kit dazugehörigen Säulen gegeben. Nach Zentrifugation (13000 U/min, RT, 1 min) wurde der Durchfluß verworfen und weitere 700 µl PE-Puffer dazugegeben. Es schlossen sich zwei weitere Zentrifugationsschritte (13000 U/min, RT, 1 min) an, wobei der letzte Schritt dem Trocknen der Säule diente. Durch Zugabe von 30 µl Elutionspuffer wurde die DNA von der Säule abgelöst und durch Zentrifugation gewonnen.

### **Enzymatischer Verdau des PCR-Produktes mit Restriktionsendonukleasen**

Restriktionsendonukleasen schneiden DNA reproduzierbar an bekannten Erkennungssequenzen, wobei sich ein spezifisches Spaltmuster ergibt, das die Identifizierung der DNA möglich macht. Die so erhaltenen DNA-Fragmente können mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden.

*Apa* I und *Pvu* II wurden genutzt, um DNA restriktionsendonukleolytisch zu schneiden. Es wurden 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA und Stunde im mitgelieferten Puffersystem bei 37 °C im Wasserbad eingesetzt. Die Konzentration der DNA betrug dabei 100 bis 200 ng/µl. Dieser zehnfache Überverdau wurde über Nacht durchgeführt. Das durch PCR amplifizierte Fragment von Semaphorin 3A war 654 bp und das von Semaphorin 3C 705 bp lang. *Pvu* II schnitt die Semaphorin 3A-DNA in ein 504 bp und ein 145 bp langes DNA-Fragment. Die Semaphorin 3C-DNA spaltete *Pvu* II in zwei Fragmente, 476 bp und 213 bp lang. Für *Apa* I gab es keine Schnittstelle in der amplifizierten Semaphorin 3A-Sequenz. Hingegen erzeugte das Restriktionsenzym durch Spaltung der amplifizierten DNA von Semaphorin 3C ein 500 bp und ein 180 bp langes DNA-Fragment. Das Ergebnis des DNA-Verdaues wurde wie unter dem Abschnitt „Polymerase-Kettenreaktion (PCR)“ beschrieben, mit einem Agarose-Gel kontrolliert.

### 3.4.3. *In-situ*-Hybridisierung gegen Semaphorin 3A und Semaphorin 3C an HEK-Zellen

Eine *in-situ*-Hybridisierung erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren am Gewebeschnitt oder in einzelnen Zellen (*in situ*). Dazu werden künstlich hergestellte Sonden eingesetzt, die spezifisch an die Zielstruktur im Gewebe binden (Hybridisierung), indem sie eine komplementäre Sequenz zur Ziel-Nukleinsäure aufweisen. Die in dieser Arbeit verwendeten RNA-Sonden waren mit Digoxigenin gekoppelt. Der Nachweis der Semaphorin-RNA in den verschiedenen Zelllinien erfolgte mit einem farbgebenden Enzym in zwei Schritten. Zunächst wurde ein anti-Digoxigenin-Antikörper, der mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert ist, eingesetzt. Der Antikörper bindet über das Digoxigenin an die RNA-Sonde. Im zweiten Schritt erfolgt der Nachweis der Alkalischen Phosphatase am Antikörper durch Zugabe von NBT (Nitroblautetrazolium) und BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyolphosphat). NBT und BCIP fungieren als Substrate für die Alkalische Phosphatase. Durch die Enzymreaktion entsteht ein dunkler Farbniederschlag, der die Ziel-RNA in den Zellen markiert.

#### Silanisieren der Deckgläser

Das Silanisieren der Deckgläser erfolgte für 5 s in Repel-Silane (GE Healthcare). Anschließend wurden die Deckgläser für je 5 s in Aceton und absolutem Ethanol gespült und luftgetrocknet.

#### Beschichtung der Objektträger und Vorbereitung der HEK-Zellen

Die Objektträger wurden zum Entkeimen mindestens 1 h in 70 % Ethanol gelegt und anschließend getrocknet. Danach erfolgte die Beschichtung mit PLL. Dazu wurde pro 1 ml GBSS 1 µl PLL dazugegeben und vermischt. Jeweils 500 µl dieser GBSS / PLL-Lösung wurden auf dem Objektträger verteilt. Die Objektträger wurden so in sterilen Petrischalen mindestens 1 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, danach mit Bidest. gewaschen und abschließend luftgetrocknet. Die Zelllinien HEK, AP-3A, AP-3C, Sema3C\_3A und Sema3C\_3a wurden in einer Zelldichte von 350.000 Zellen pro Objektträger aufgebracht. Die Zellen wurden von jeweils konfluent-bewachsenen Petrischalen geerntet (siehe Abschnitt 3.2.1.) und mit der Neubauer-Kammer ausgezählt. Nach dem Adhären der Zellen wurden die Objektträger mit Zellkulturmedium überschichtet und für 24 h im Brutschrank belassen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

### ***In-situ*-Hybridisierung**

Die *in-situ*-Hybridisierung verlief in Kooperation mit Diplom-Biologin Sandra Barchmann, die freundlicherweise die Sema3A- und die Sema3C-Sonde, sowie die Torula-RNA zur Verfügung stellte.

Das Zellkulturmedium wurde verworfen und die Objektträger zunächst mit PBS<sub>DT</sub> gespült. Die HEK-Zellen wurden 20 min in 4 % PFA / PBS<sub>DT</sub> fixiert. Die Präparate wurden zur Permeabilisierung 10 min in 0,1 M HCl<sub>DT</sub> inkubiert. Zur Reduktion des Hintergrundes bei der späteren Farbreaktion wurden die HEK-Zellen 20 min in 5 mM Acetanhydrid in 0,1 M TEA acetyliert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils für 5 min mit PBS<sub>DT</sub> gespült. Zur Dehydration der Präparate durchliefen die Objektträger eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %, 70 %, 96 % und 100% Ethanol<sub>DT</sub>). Die Objektträger verblieben dort jeweils 10 min und wurden nach der Inkubation im 100 %-igen Ethanol luftgetrocknet. Während der Trocknung der Objektträger wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet. Diese setzte sich wie folgt zusammen: 50 % Formamid, 5x SSC, 0,4 mg/ml Torula-RNA, 0,1 mg/ml tRNA und H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub>. Der *in-situ*-Hybridisierungslösung wurde die Digoxigenin-markierte Sonde in einer Konzentration von 3 ng/ml zugesetzt. Im Thermoschüttler wurde diese Lösung für 3 min bei 99 °C denaturiert und auf Eis abgeschreckt. Nach Zugabe von 5x Denhardt's Reagenz wurde die Hybridisierungslösung erneut 3 min auf 70 °C erwärmt. Eine feuchte Kammer wurde in der Zwischenzeit mit Whatman-Papier ausgelegt und mit 5x SSC / 50 % Formamid getränkt. Die Objektträger wurden in die feuchte Kammer gelegt, mit je 145 µl Hybridisierungslösung benetzt und mit silanisierten Deckgläsern bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungssofen bei 66 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Deckgläser in 5x SSC bei RT von den Objektträgern abgespült. Bei Hybridisierungstemperatur wurden die Präparate 30 min in 2x SSC / 50 % Formamid und anschließend für 60 min in 0,2x SSC gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Objektträger für 15 min in 0,2x SSC sowie 5 min in MaBS bei RT. Um unspezifischen Bindungen des anti-Digoxigenin-Antikörpers vorzubeugen, wurden die HEK-Zellen 3 h bei RT in Blockierungslösung blockiert. Die Antikörperinkubation erfolgte in Blockierungslösung über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Dazu wurden pro Objektträger 150 µl der Antikörperlösung aufgetragen und mit Parafilm abgedeckt. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Objektträger 3 mal 10 min in MaBS gewaschen und anschließend 5 min in Reaktionspuffer, der zur Inhibierung der endogenen Phosphatasen eine Spatelspitze Levamisol enthielt, umgepuffert. Die Farbreaktion wurde gestartet, indem pro Objektträger 750 µl der Substratlösung (50 µl NBT und 37,5 µl BCIP auf 10 ml Reaktionspuffer) aufgetragen wurde. Die Farbreaktion verlief bis

zu 24 h im Dunkeln in einer feuchten Kammer und wurde durch Waschen mit PBS bei allen Zelllinien gleichzeitig gestoppt. Die Präparate wurden mit Mowiol eingedeckelt.

### 3.5. Mikroskopie

Für die Analyse der verschiedenen *in-vitro*-Experimente wurde ein inverses Mikroskop in Kombination mit einer Spot-Farbkamera und dazugehöriger Software verwendet. Es wurden ein 10x Objektiv (numerische Apertur: 0,30) sowie ein 20x Objektiv (numerische Apertur: 0,50) von ZEISS genutzt. Die Anregung der mit Cy3 markierten Axone erfolgte mit Licht der Wellenlänge von 530 nm bis 560 nm. EGFP-exprimierende Neurone wurden hingegen mit Licht der Wellenlänge 450 nm bis 490 nm angeregt. Zusätzlich wurden von den Co-Kultur-Experimenten Aufnahmen an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop mit einem 10x Objektiv (numerische Apertur: 0,45) gemacht. Für Aufnahmen der EGFP-Explantate wurde ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und ein Bandpass von 500 bis 550 nm als Emissionsfilter angewendet.

### 3.6. Analyse der *in-vitro*-Experimente

Von den Explantaten bzw. Einzelzellen auf den verschiedenen Substraten wurden Phasenkontrastaufnahmen am inversen Mikroskop gemacht. Insbesondere die Länge der ausgewachsenen Fasern wurde unter Verwendung der *ImageJ*-Software aus den fotografischen Aufnahmen ermittelt. Zur statistischen Analyse wurde mit den Daten zur Faserlänge und Faseranzahl ein t-Test mit der Software *Statview* durchgeführt. Die Daten zur Orientierung der Fasern in den Streifengradienten sowie in den „slice overlay“-Experimenten wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (*SPSS 10.0* Software) statistisch ausgewertet.

#### 3.6.1. Analyse des axonalen Auswachsens an cortikalen Explantaten im Streifenassay

Alle auf dem Deckglas befindlichen Explantate wurden mit 10-facher Vergrößerung fotografiert. Die auf den Membran- und Interstreifen ausgewachsenen Axone wurden pro Explantat gezählt. Mit dem *ImageJ*-Programm wurden jeweils die fünf längsten Axone vermessen.

### 3.6.2. Analyse der Co-Kultur-Experimente

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens von cortikalen Axonen in löslichen Semaphorin-Gradienten wurden von jedem um das Zellaggregat befindlichen Explantat zwei Fotos mit dem 10x Objektiv und 1,6 Optovar angefertigt. Eine fotografische Aufnahme dokumentierte das Wachstumsverhalten in Richtung Zellaggregat, die zweite Aufnahme das Wachstumsverhalten vom Zellaggregat weg. Es wurden nur Axone in die Analyse einbezogen, die geradlinig in Richtung Zellaggregat oder vom Zellaggregat weg wuchsen. Dabei wurden die Anzahl der Axone quantifiziert, sowie jeweils die fünf längsten Axone mit *ImageJ* vermessen.

Bei der Analyse der trophischen Eigenschaft der Explantatkulturen wurden die cortikalen Explantate nach Anzahl der wegwachsenden Axone gruppiert und die jeweiligen Axonlängen gemittelt. In einem Diagramm wurde dann die Anzahl der vom Aggregat wegwachsenden Axone gegen die Mittelwerte der axonalen Länge aufgetragen (z.B. Abb. 4.6). Jeder Punkt im Diagramm entspricht somit einer bestimmten Anzahl cortikaler Explantate (n), die die gleiche Zahl wegwachsender Axone aufwies. Um die Streuung gering zu halten, musste eine Gruppierung mindestens 4 Explantate aufweisen. Zu jeder Datenreihe wurde die Regressionsgerade berechnet und die Anstiege der Geraden mittels „Test der Regressionskoeffizienten“ statistisch verglichen (Kreyszig, 1979). Die Anstiege der Regressionsgeraden sowie die Korrelationskoeffizienten  $r$  der jeweiligen Datenreihen sind in den Diagrammen wiedergegeben. Der Korrelationskoeffizient  $r$  ist dabei ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen Axonanzahl und Axonlänge. Liegt er bei Null, so besteht kein linearer Zusammenhang zwischen Axonanzahl und Axonlänge. Werte bis +1 deuten dagegen auf einen positiven linearen Zusammenhang hin. Auf die gleiche Art und Weise wurde auch das Wachstumsverhalten der Axone, die auf die Zellaggregate zuwuchsen, analysiert.

Bei Co-Kulturen, denen der funktionell blockierende Antikörper gegen Neuropilin-2 zugesetzt wurde, wurden für das Auswachsen der Fasern vom Explantat Nummern vergeben (Abb. 3.4 A bis C):

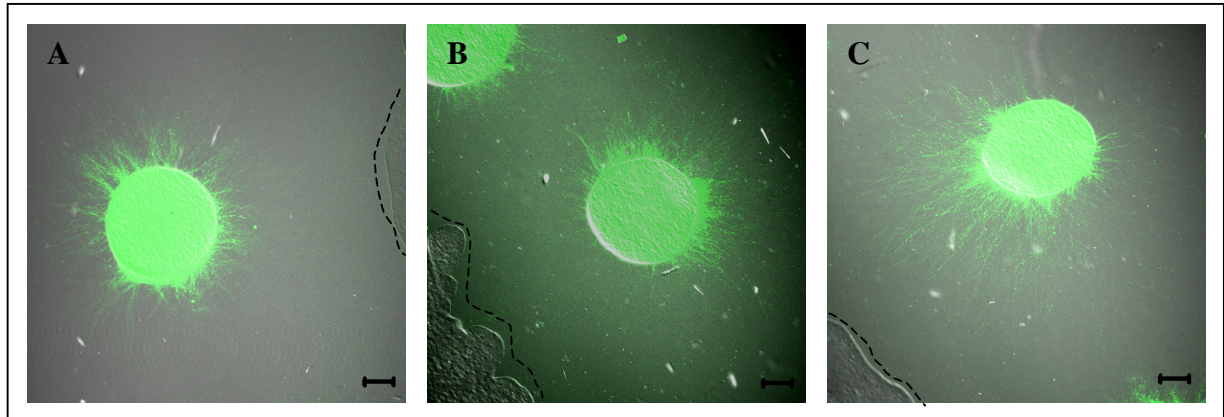
0 → radial gleichmäßiges Auswachsen der Axone vom Explantat;

-1 → die Axone wachsen vermehrt vom Zellaggregat weg (repulsiv)

+1 → die Axone wachsen vermehrt in Richtung Zellaggregat (attraktiv).

Das Wachstumsverhalten aller Explantate unter einer Bedingung wurde verrechnet und in einem Diagramm graphisch dargestellt. Werte größer als Null bedeuteten demnach ein attraktives Wachstumsverhalten der cortikalen Axone. Werte kleiner als Null wiesen auf ein

repulsives Wachstumsverhalten hin. Die statistische Analyse wurde in diesem Fall mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt.



**Abb. 3.4: Fotografische Aufnahmen von Co-Kultur-Experimenten mit EGFP-Explantaten.** **A)** Die Axone wachsen gleichmäßig in alle Richtungen vom Explantat aus: Nummer 0. **B)** Die Axone wachsen vermehrt vom Zellaggregat weg: Nummer -1. **C)** Die Axone wachsen in großer Anzahl in Richtung des Zellaggregates: Nummer +1. Die gestrichelte Linie markiert die Position des jeweiligen Zellaggregates. Balken: 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.6.3. Analyse des Verhaltens von cortikalen Einzelzellen in Membrangradienten

Um das Verhalten von cortikalen Neuronen auf membrangebundenen Semaphorin-Gradienten zu untersuchen, wurden nur die Zellen verwendet, deren Zellkörper auf den Membranstreifen lokalisiert war. Außerdem durfte das ausgewachsene Axon den Membranstreifen nicht verlassen, um in die Analyse der Axonlänge einzufließen. Alle cortikalen Einzelzellen im Gradienten, die diese Kriterien erfüllten, wurden mit dem 20x Objektiv und zusätzlichen 1,6 Optovar im Phasenkontrast fotografiert. Analysiert wurde neben der Anzahl der Neurone auf den Inter- und Membranstreifen auch die Orientierung der Axone und Dendriten im Gradienten, d.h. zur höheren oder zur niederen Membrankonzentration, sowie die axonale und dendritische Länge mit der *ImageJ*-Software.



#### **3.6.4. Analyse des Wachstumsverhaltens cortikaler EGFP-Neurone auf coronalen Schnitten**

Von den Schnitten wurden alternierend Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen mit dem 20x Objektiv gemacht. Die Einzelbilder wurden mit der *Photoshop*-Software zusammengesetzt. Es wurden nur EGFP-positive Zellen in die Auswertung einbezogen, die in der Intermediärzone (IZ) des somatosensorischen Cortex auswuchsen. Dazu wurde der Cortex der Länge nach gedrittelt; das mittlere Drittel entsprach dem somatosensorischen Cortex. Weiterhin wurde der somatosensorische Cortex horizontal in drei gleich große Streifen geteilt; der mittlere Bereich entsprach der IZ Cortex. So ausgewählte EGFP-Zellen wurden nach der Orientierung ihres Neurits zur cortikalen Platte (CP) oder zur Ventrikulärzone (VZ) des Cortex analysiert (Abb.: 3.3 D). Dabei wurden nur Neuriten in die Analyse einbezogen, wenn sie in einem Winkel von  $45^{\circ}$  -  $135^{\circ}$  zur CP bzw.  $225^{\circ}$  -  $315^{\circ}$  zur VZ wuchsen. Das geradlinige Wachstum der Neuriten in Richtung der Pia matter entsprach dabei einem Winkel von  $90^{\circ}$ . In der IZ horizontal verlaufende Fasern wurden nicht in der Analyse berücksichtigt. Die Faserlänge sowie die Winkel wurden mit *ImageJ* vermessen.

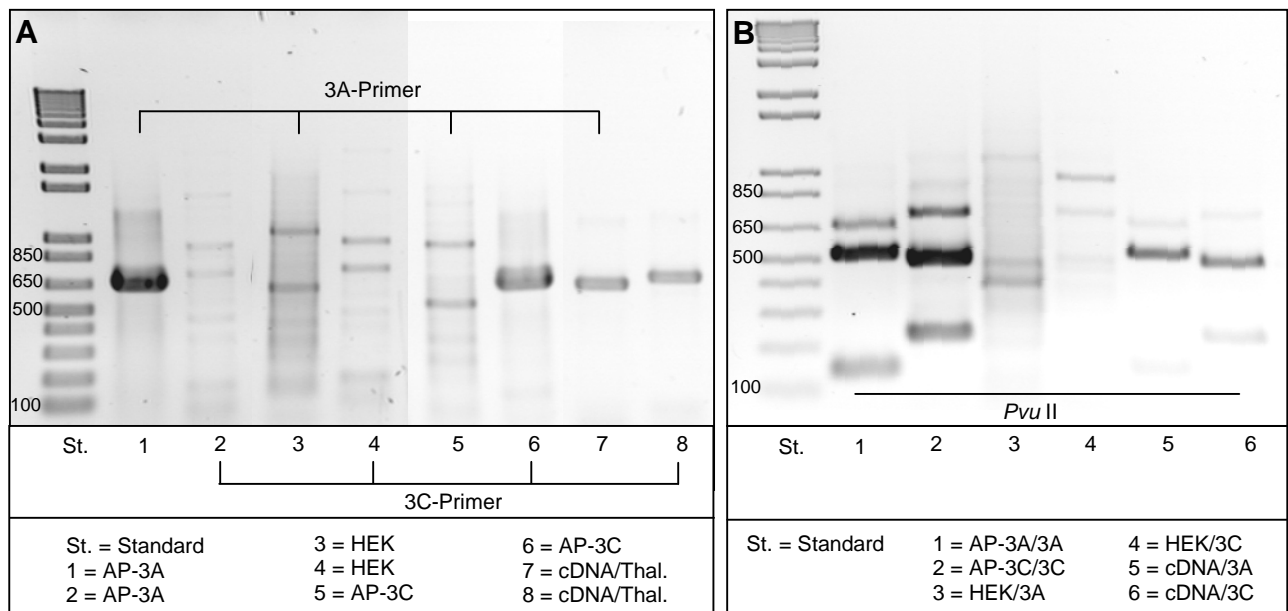
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung der Zelllinien mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und *in-situ*-Hybridisierung

#### 4.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Charakterisierung der Zelllinien, wie auch zur Überprüfung des Expressionsmusters wurde aus den Zelllinien AP-3A, AP-3C, Sema3C\_3A, Sema3C\_3a sowie der HEK-Kontrollzelllinie RNA isoliert und im ersten Schritt revers transkribiert. Diese Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde genspezifisch mit Primern für Semaphorin 3A und Semaphorin 3C durchgeführt. Im zweiten Schritt wurde die so erhaltene DNA unter Verwendung der jeweiligen Primer durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der dritte Schritt beinhaltete die Reinigung und den restriktionsendonukleolytischen Verdau des PCR-Produktes, um die Semaphorin-Banden sicher zu identifizieren.

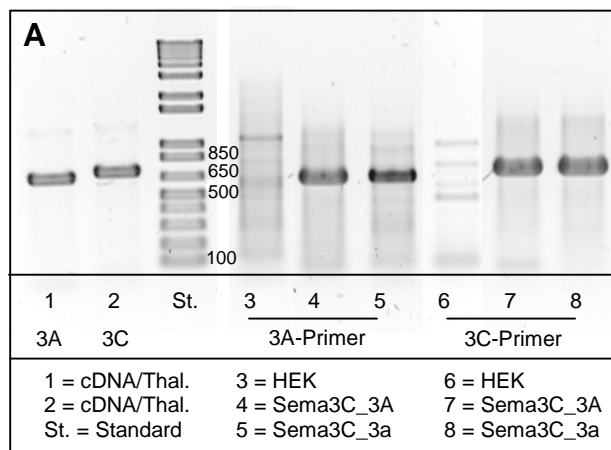
**AP-Zelllinien (Abb. 4.1):** Die HEK-Kontrollzelllinie exprimierte weder Sema3A noch Sema3C, da der Verdau mit *Apa* I und *Pvu* II kein typisches Restriktionsmuster ergab.



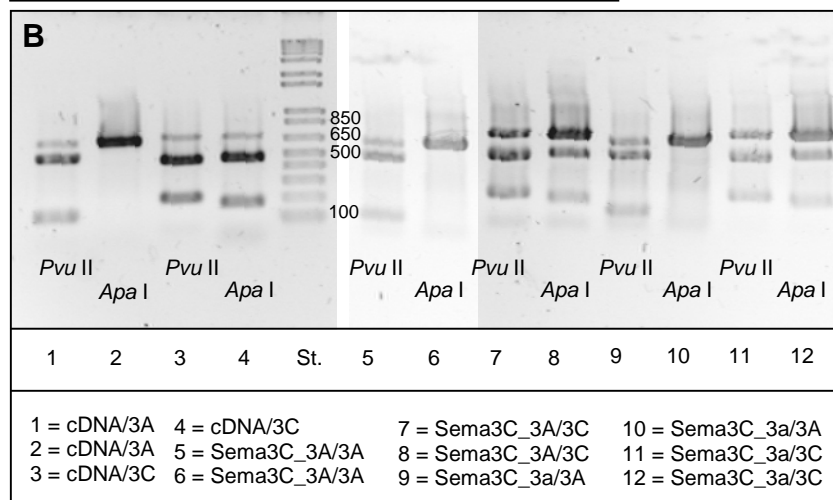
**Abb. 4.1: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsverdau der cDNA der AP-Zelllinien.**  
**A):** Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte lag die für Sema3A charakteristische Bande bei 654 bp; für Sema3C bei 705 bp. Die AP-3A-Zellen wurden positiv auf Sema3A getestet; die AP-3C-Zellen positiv auf Sema3C. Die Kontrollzelllinie HEK exprimierte keine Semaphorine. **B):** Die bei der PCR als Sema3A und Sema3C angenommenen Banden wurden durch Restriktionsverdau sicher als diese identifiziert. Bei den cDNA-Proben handelte es sich um Positivkontrollen für die beiden Semaphorine aus dem Thalamus, wo Sema3A und Sema3C exprimiert waren. Beschriftung: Bsp.: 1 = Zelllinie AP-3A/PCR-Primer 3A.

Die PCR ergab bei den AP-3A-Zellen sowie der Positivkontrolle für Sema3A die entsprechende Sema3A-Bande im Größenbereich von 650 bp. Der Restriktionsverdau mit *Pvu* II bestätigte durch die Spaltung der Amplifikate in die typischen Fragmente (504 bp und 145 bp) das Vorhandensein von Sema3A. Die für Sema3C charakteristische Bande bei 705 bp trat bei den AP-3C-Zellen und der Positivkontrolle für Sema3C auf. Das typische Spaltungsmuster (476 bp und 213 bp) nach dem restriktionsendonukleolytischen Verdau identifizierte die durch PCR erhaltenen 705 bp-Banden sicher als Sema3C-DNA. Die AP-Zelllinien exprimierten jeweils nur ein Semaphorin. Die AP-3A-Zellen wurden negativ auf Sema3C getestet; dementsprechend exprimierten die AP-3C-Zellen kein Sema3A.

**Gemischte Zelllinien (Abb. 4.2):** Eine markante 650 bp-Bande war nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte der gemischten Zelllinien Sema3C\_3A und Sema3C\_3a sichtbar. Die Positivkontrolle für Sema3A und der Restriktionsverdau mit *Pvu* II bestätigte die Annahme, dass es sich um die Sema3A-Bande handelte. *Apa* I schnitt die Sema3A-DNA nicht.



**Abb. 4.2: Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Restriktionsverdau der cDNA der Sema3C\_3A- und Sema3C\_3a-Zelllinien. A):** PCR: Beide Zelllinien zeigten die für Sema3A charakteristische Bande bei 654 bp und die für Sema3C bei 705 bp. **B):** Die bei der PCR als Sema3A und Sema3C erhaltenen Banden wurden durch Restriktionsverdau sicher als diese identifiziert. Beschriftung: Bsp.: 5 = Zelllinie Sema3C\_3A/PCR-Primer 3A. Bemerkung: Die Daten wurden aus jeweils drei Agarose-Gelen zusammengestellt.



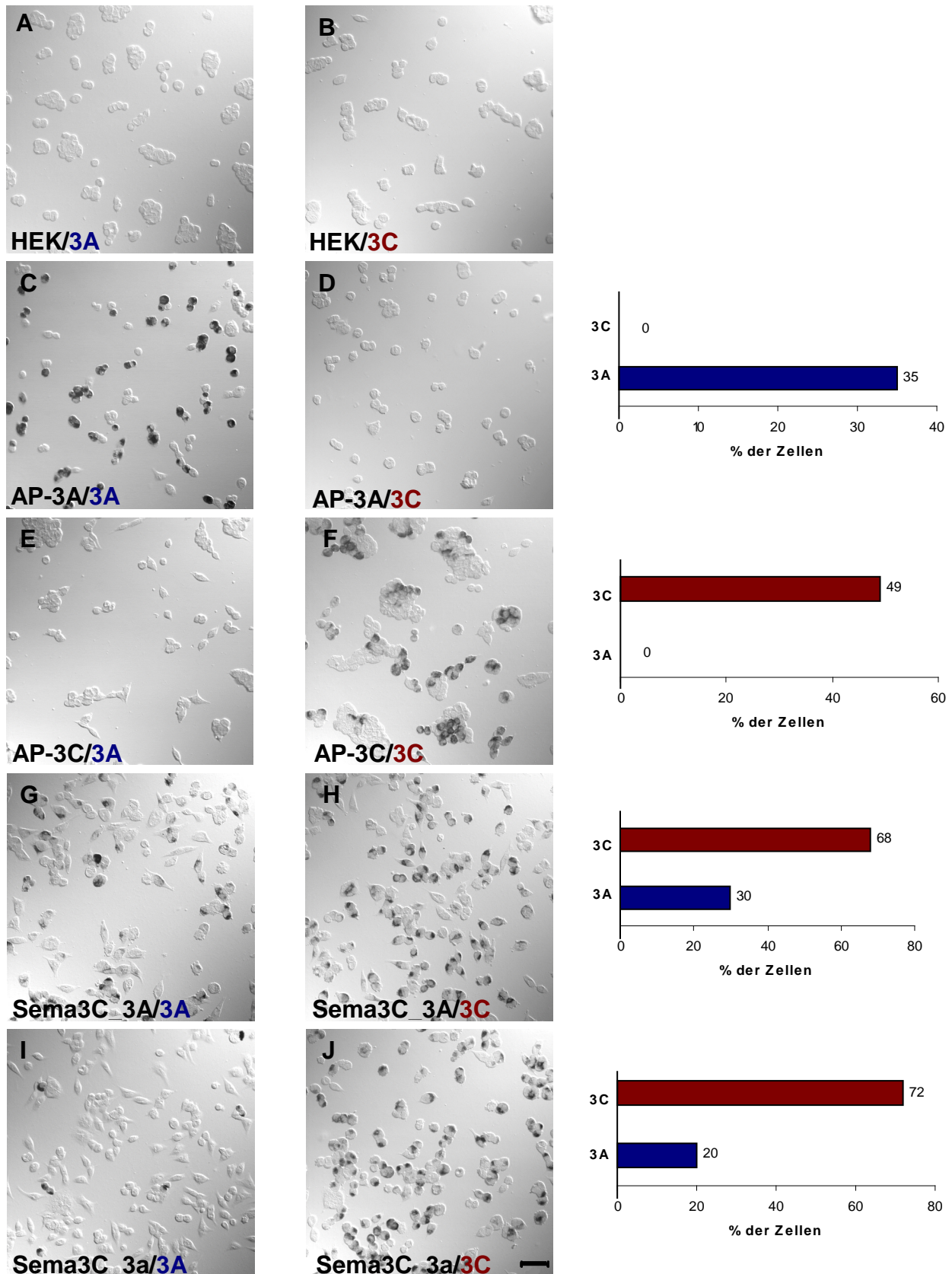
Die Zelllinien Sema3C\_3A und Sema3C\_3a wurden weiterhin positiv auf eine Sema3C-Expression getestet. Im Größenbereich von 700 bp gab es eine deutliche Bande bei beiden Zellgemischen sowie der Positivkontrolle für Sema3C. Die durch *Apa* I und *Pvu* II erhaltenen DNA-Fragmentmuster der 700 bp-Bande bestätigten die Identifizierung der Sema3C-Bande. Beide Restriktionsenzyme erzeugten jeweils zwei charakteristische Fragmente unterschiedlicher Größe (*Apa* I: 500 bp und 180 bp; *Pvu* II 476 bp und 213 bp). Demnach exprimierten die Sema3C\_3A- und Sema3C\_3a-Zelllinie sowohl Sema3A als auch Sema3C.

#### 4.1.2. *In-situ*-Hybridisierung

Mittels *in-situ*-Hybridisierung wurde die Sema3A- und Sema3C-Expression in den Zelllinien quantifiziert (Abb. 4.3).

**AP-Zelllinien:** Die HEK-Kontrollzelllinie wies weder eine Expression von Sema3A noch eine Expression von Sema3C auf. Dagegen war bei den AP-Zelllinien AP-3A und AP-3C ein starkes Hybridisierungssignal zu beobachten. Die AP-3A-Zellen wurden positiv auf Sema3A getestet. Nach Quantifizierung der *in-situ*-Hybridisierungen ergab sich folgendes Ergebnis: 49% der AP-3A-Zellen exprimierten Sema3A. Die restlichen 51% der Zellen zeigten keine Expression von Sema3A. Kein Signal ergab die *in-situ*-Hybridisierung gegen Sema3C; die AP-3A-Zellen exprimierten also ausschließlich Sema3A. Ein grundsätzlich anderes Expressionsmuster zu den AP-3A-Zellen wiesen die AP-3C-Zellen auf. 35% der AP-3C-Zellen wurden positiv auf Sema3C untersucht. Negativ getestet auf Sema3C wurden die restlichen 65% der AP-3C-Zellen. Der Einsatz der Sema3A-Sonde bei der AP-3C-Zelllinie erbrachte kein positives Expressionssignal. Die AP-Zelllinien exprimierten demzufolge jeweils nur ein Semaphorin.

**Gemischte Zelllinien:** Bei den Zellgemischen Sema 3C\_3A und Sema 3C\_3a wurde anhand *in-situ*-Hybridisierung der Gehalt an Sema3A und Sema3C quantifiziert. Beide Zellgemische wiesen einen annähernd gleichen Sema3C-Gehalt auf. 68% der Sema3C\_3A-Zellen und 72% der Sema3C\_3a-Zellen exprimierten Sema3C. Im Sema3A-Gehalt unterschieden sich hingegen die beiden Zelllinien. Ein Drittel der Sema3C\_3A-Zellen (30%) wurden positiv auf Sema3A getestet. In der Sema3C\_3a\_Zelllinie exprimierten dagegen nur 20% der Zellen Sema3A.



**Abb. 4.3: *In-situ*-Hybridisierung gegen Sema3A und Sema3C an den verschiedenen HEK-Zelllinien. A) bis J):** DIC-Aufnahmen der Zelllinien. Jede Zelllinie wurde mit der Sema3A- (rote Beschriftung) und Sema3C-Sonde (blaue Beschriftung) behandelt. **A) und B):** HEK-Kontrollzelllinie. **C) und D):** AP-3A-Zellen. **E) und F):** AP-3C-Zellen. **G) und H):** Sema3C\_3A-Zellen. **I) und J):** Sema3C\_3a-Zellen. Balken: 50  $\mu$ m. Die Balkendiagramme neben den Fotografien verdeutlichen den Sema3A- bzw. Sema3C-Gehalt.

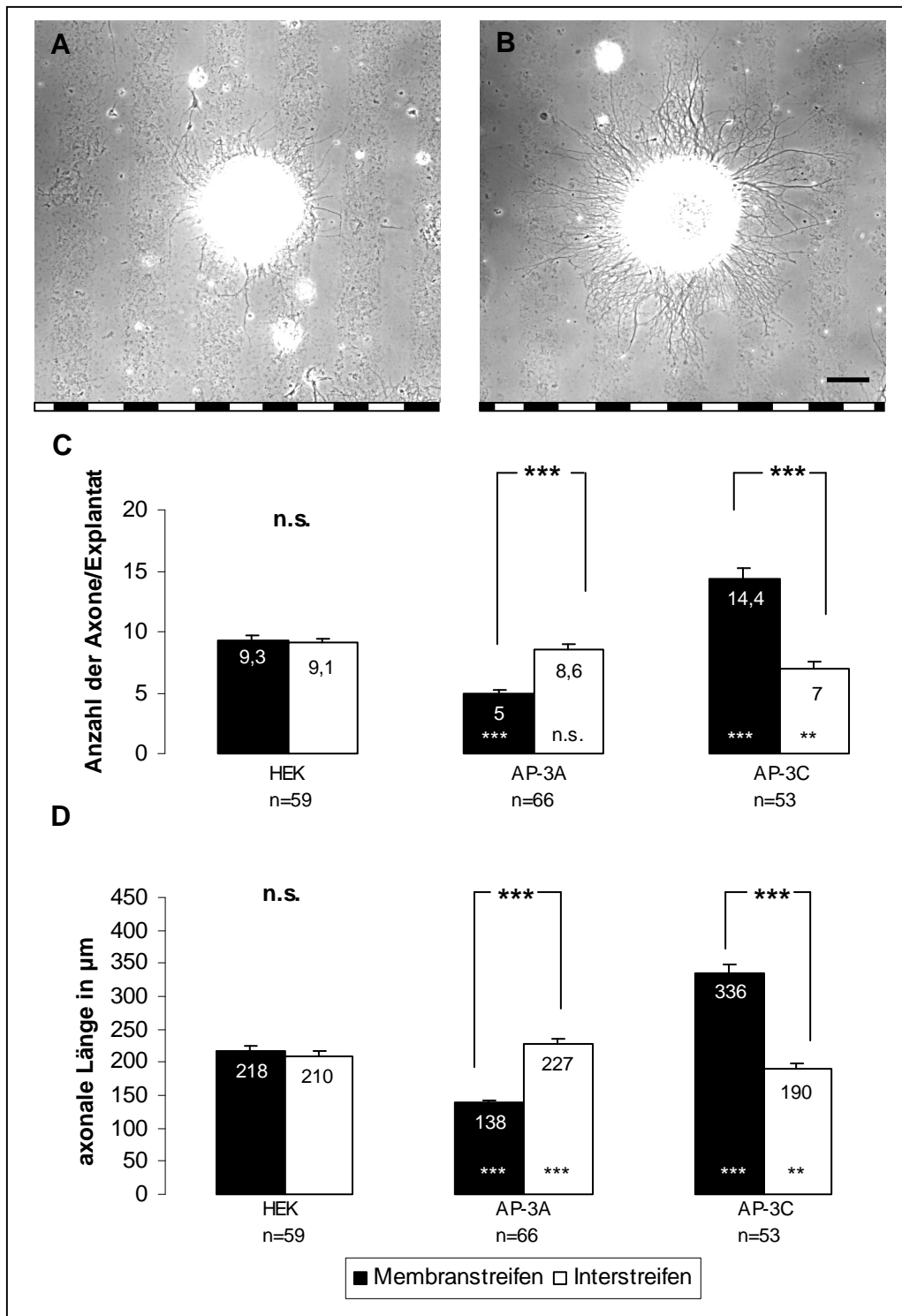
## **4.2. Der Einfluss von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone *in vitro***

Alle unter dem Abschnitt 4.2. dargestellten *in-vitro*-Experimente wurden ausschließlich unter Verwendung der Zelllinien AP-3A, AP-3C sowie der Kontrollzelllinie HEK durchgeführt. Da die beiden Klasse-3-Semaphorine *in vivo* in membrangebundener als auch in diffusibler Form vorkommen, wurden die *in-vitro*-Experimente folgendermaßen designt. Zum einen wurden die Semaphorine den cortikalen Axonen in membrangebundener Form im Streifen- und Gradientenassay angeboten. Dazu wurden nur die semaphorinhaltigen Membranen der Zellen verwendet. Zum anderen dienten die Zellen zur Herstellung von Zellaggregaten in der Co-Kultur. Dabei sezernierten die Zellen Sema3A bzw. 3C, um den Einfluss der diffusiblen Semaphorine auf cortikale Axone zu testen.

### **4.2.1. Die Effekte von membrangebundenen Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf cortikale Axone**

Cortikale Explantate wurden im sogenannten Streifenassay *in vitro* kultiviert. Der Streifenassay bot den auswachsenden cortikalen Axonen zwei Substrate zur Wahl an: Laminin-Poly-L-Lysin-Substrat (Interstreifen) oder semaphorinhaltige Membranen (Membranstreifen). Für zwei Tage wurden die cortikalen Explantate (E15) auf den Streifen substraten kultiviert. Anschließend wurde die Anzahl sowie die Länge, der auf Inter- bzw. Membranstreifen ausgewachsenen cortikalen Axone analysiert. Die quantitative Analyse der Streifenassays ist in Abb. 4.4 C) und D) wiedergegeben.

Wechselten sich Laminin-Poly-L-Lysin-Streifen (Interstreifen) mit Membranstreifen, präpariert von der HEK-Kontrollzelllinie, ab, so war keine Präferenz der cortikalen Fasern für ein Substrat zu beobachten. Es wuchsen jeweils ca. 9 Axone pro Explantat auf Membranstreifen bzw. Interstreifen aus. Die im Kontroll-Streifenassay ausgewachsenen cortikalen Axone auf Membran- und Interstreifen waren zudem ungefähr gleich lang (Abb. 4.4 C) und D). Somit stellten die HEK-Membranstreifen für die von den Explantaten auswachsenden Axone kein bevorzugtes Wachstumssubstrat dar.



**Abb. 4.4: Quantitative Analyse der Streifenassays. A) und B):** Phasenkontrast-Aufnahmen von corticalen Explantaten auf Streifenassays mit Sema3A-haltigen (A) und Sema3C-haltigen Membranen (B). Balken: 100 μm. **C):** Quantitative Analyse der Anzahl der Axone pro Explantat. **D):** Quantitative Analyse der axonalen Länge. Es wuchsen weniger und kürzere Axone auf AP-3A-Streifen im Vergleich zu Kontrollmembranstreifen. Dagegen wuchsen die Axone vermehrt auf AP-3C-Streifen, wobei die Fasern deutlich länger waren als die Kontrolle. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Explantate; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \*\* =  $p \leq 0,001$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.

### **Cortikale Axone meiden Semaphorin 3A, bevorzugen dagegen aber Semaphorin 3C**

Wurde das Cortextgewebe auf alternierenden Streifen aus Sema3A-haltigen Membranen und Laminin-Poly-L-Lysin kultiviert, so bevorzugten die cortikalen Axone das Laminin-Poly-L-Lysin-Substrat und meideten die AP-3A-Membranen (Abb. 4.4 A), C) und D). Durchschnittlich wuchsen auf den Sema3A-haltigen Membranen pro Explantat 5 Axone aus. Auf den Interstreifen wuchsen dagegen rund 9 Axone mit einer mittleren Länge von 227  $\mu\text{m}$  pro Explantat aus. Die Fasern, die auf Sema3A-haltigen Membranen wuchsen, erreichten dagegen nur eine Länge von 138  $\mu\text{m}$ . Die geringe Anzahl der auf Sema3A-haltigen Membranen wachsenden Axone, sowie deren reduzierte Länge, lässt darauf schließen, dass membrangebundenes Sema3A repulsiv auf auswachsende cortikale Axone wirkt.

Abb. 4.4 B) zeigt einen Streifenassay, bei dem sich Laminin-Poly-L-Lysin-Streifen mit Sema3C-haltigen Membranstreifen abwechselten. Es ist deutlich zu sehen, dass die, von den Explantaten auswachsenden Axone die Membranstreifen bevorzugten. Im Mittel befanden sich 14 Axone pro Explantat auf den Membranstreifen (Abb. 4.4 C) und D). Auf den Interstreifen wuchsen signifikant weniger Axone aus; pro Explantat 7 Axone. Fasern, die auf den Sema3C-Membranstreifen auswuchsen, waren zudem signifikant länger (336  $\mu\text{m}$ ) als Fasern auf den Interstreifen (190  $\mu\text{m}$ ). Die erhöhten Werte für die Axonanzahl und die Axonlänge auf den Sema3C-haltigen Membranen im Vergleich zu den Interstreifen legen nahe, dass Sema3C eine attraktive Wirkung auf cortikale Axone hat.

#### **4.2.2. Der Einfluss von diffusiblen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf cortikale Axone**

Um den Einfluss von löslichem Sema3A und 3C auf das Auswachsen von cortikalen Axonen zu untersuchen, wurden die Semaphorin-sezernierenden Zelllinien AP-3A und AP-3C mit cortikalen Explantaten co-kultiviert. Die auswachsenden cortikalen Axone waren somit je nach Wachstumsrichtung mit einem abnehmenden oder zunehmenden Semaphorin-Gradienten konfrontiert. Gegenstand der Analyse war das Wachstumsverhalten der cortikalen Axone, die in Richtung des Zellaggregates und vom Aggregat weg wuchsen. Die Quantifizierung der Analyse der Co-Kultur-Experimente ist in Abb. 4.5 D) und E) dargestellt.

Die Co-Kultivierung von Zellaggregaten der Kontrollzelllinie und den cortikalen Explantaten (Abb. 4.5 A) ergab, dass sich die Anzahl der Axone, die vom HEK-Zellaggregat weg wuchsen, nicht von der Anzahl der Axone, die in Richtung des Zellaggregates wuchsen, unterschied. Im Mittel wuchsen pro Explantat jeweils 12 Axone auf das HEK-Zellaggregat zu und davon weg. Auch war die Länge der ausgewachsenen Axone in beide Richtungen vom



Zellaggregat gleich, sie betrug im Mittel 298  $\mu\text{m}$ . Aggregate von HEK-Zellen hatten somit keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Axonen.

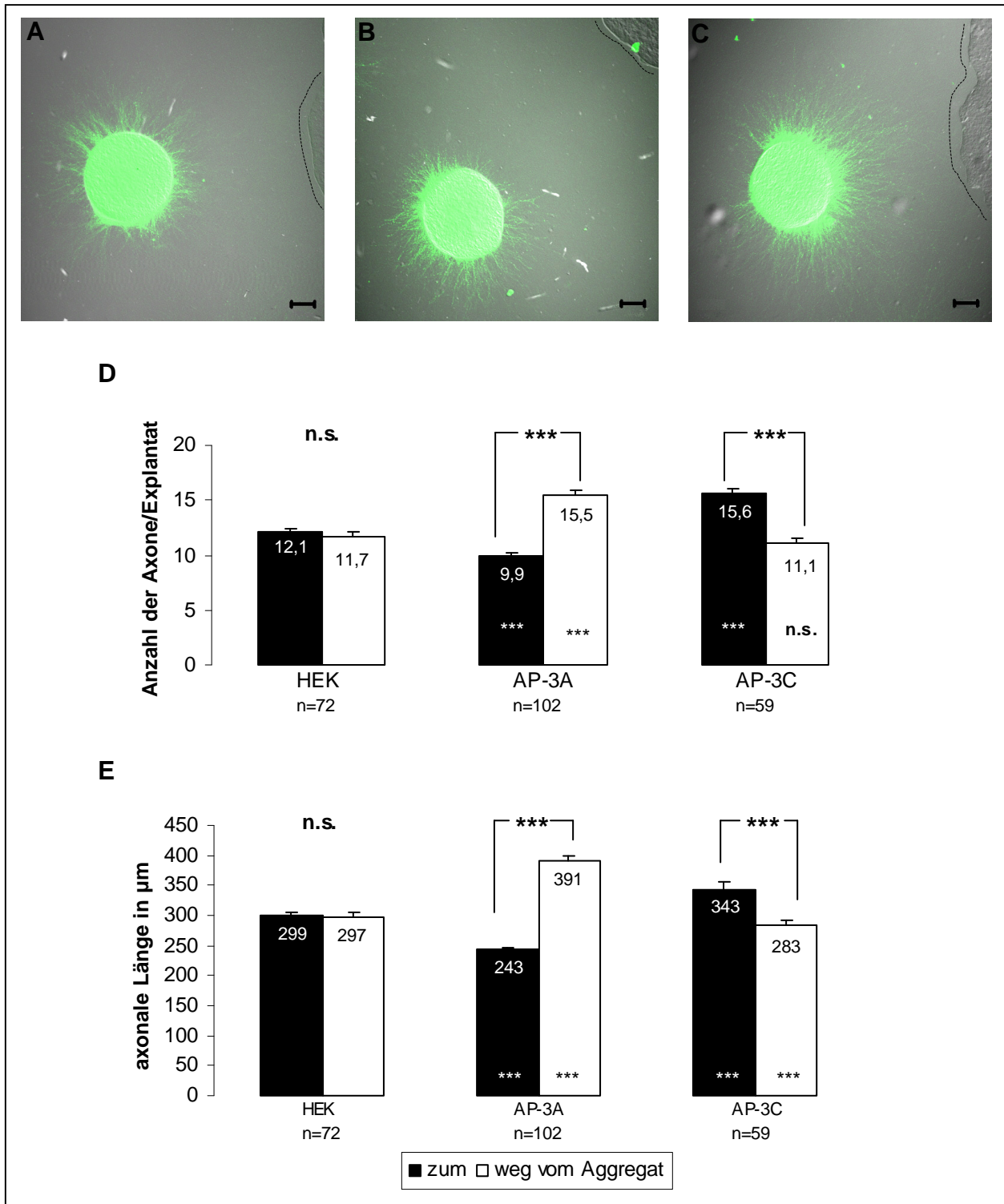
### **Zunehmende Semaphorin 3A-Gradienten wirken inhibitorisch auf Anzahl und Länge cortikaler Axone**

Dagegen waren cortikale Fasern, die in Richtung eines AP-3A-Zellaggregates wuchsen (243  $\mu\text{m}$ ), deutlich kürzer als Fasern, die vom Zellaggregat weg wuchsen (391  $\mu\text{m}$ ). Der prozentuale Unterschied zwischen der Länge der Axone, die in Richtung eines AP-3A-Zellaggregates wuchsen, und der Axone, die vom AP-3A-Zellaggregat weg wuchsen, lag bei über 60%. Zudem waren es auch signifikant weniger Axone, die auf die Sema3A-Quelle zu wuchsen (Abb. 4.5 B). Die verminderte Anzahl, der auf ein AP-3A-Zellaggregat zu wachsenden Axone sowie deren reduzierte Axonlänge lässt vermuten, dass das lösliche Sema3A einen inhibitorischen Effekt auf auswachsende cortikale Fasern hatte.

Der Vergleich mit dem Kontrollexperiment unterstützt zunächst die Vermutung, dass lösliches Sema3A repulsiv auf cortikale Axone wirkte. In Richtung eines zunehmenden Sema3A-Gradienten wuchsen signifikant weniger Axone. Waren es im Kontrollexperiment im Mittel 12 Axone pro Explantat, so reduzierte sich unter Sema3A-Einfluss die Anzahl der ausgewachsenen Axone um ca. 20% auf rund 9. Im Vergleich zur Kontrolle waren diese Axone außerdem um ca. 20% kürzer.

### **Zunehmende Semaphorin 3C-Gradienten wirken wachstumsfördernd auf cortikale Axone**

Wurden cortikale Explantate mit Zellaggregaten der AP-3C-Zelllinie co-kultiviert, so wuchsen vermehrt Axone in Richtung des Aggregates, als abgewendet von der Sema3C-Quelle (Abb. 4.5 C). Diese cortikalen Axone waren mit 343  $\mu\text{m}$  auch länger als Axone, die von der Sema3C-Quelle wegwuchsen (283  $\mu\text{m}$ ). Auch der Vergleich mit den Kontrollexperimenten legt nahe, dass im Gegensatz zum Sema3A, Sema3C einen wachstumsfördernden Effekt auf cortikale Axone ausübte. Wenn cortikale Axone auf eine Sema3C-Quelle zuwuchsen, waren sie im Vergleich zur Kontrolle 15% länger. Außerdem wuchsen rund 30% mehr Axone auf die AP-3C-Aggregate zu. Waren es im Kontrollexperiment rund 12, so erhöhte sich die Anzahl der Axone pro Explantat bei AP-3C-Aggregaten auf 16.



**Abb. 4.5: Quantitative Analyse der Co-Kultur-Experimente. A) bis C):** Aufnahmen von EGFP-Explantaten und Zellaggregaten: A) HEK-Kontrolle; B) AP-3A: repulsives Wachstumsverhalten; C) AP-3C: attraktives Wachstumsverhalten. Die gestrichelte Linie verdeutlicht die Position des jeweiligen Zellaggregates. Balken: 100  $\mu\text{m}$ . **D):** Quantitative Analyse der Anzahl der Axone pro Explantat. **E):** Quantitative Analyse der axonalen Länge, von Fasern, die zum oder weg vom Zellaggregat wuchsen. Im Vergleich zur Kontrolle wuchsen in Richtung des AP-3A-Zellaggregates weniger und kürzere Axone. Die Fasern, die dagegen vom AP-3A-Zellaggregat weg wuchsen, waren deutlich länger als die Kontrolle; wie auch die Fasern, die in Richtung eines AP-3C-Aggregates wuchsen. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Explantate; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.

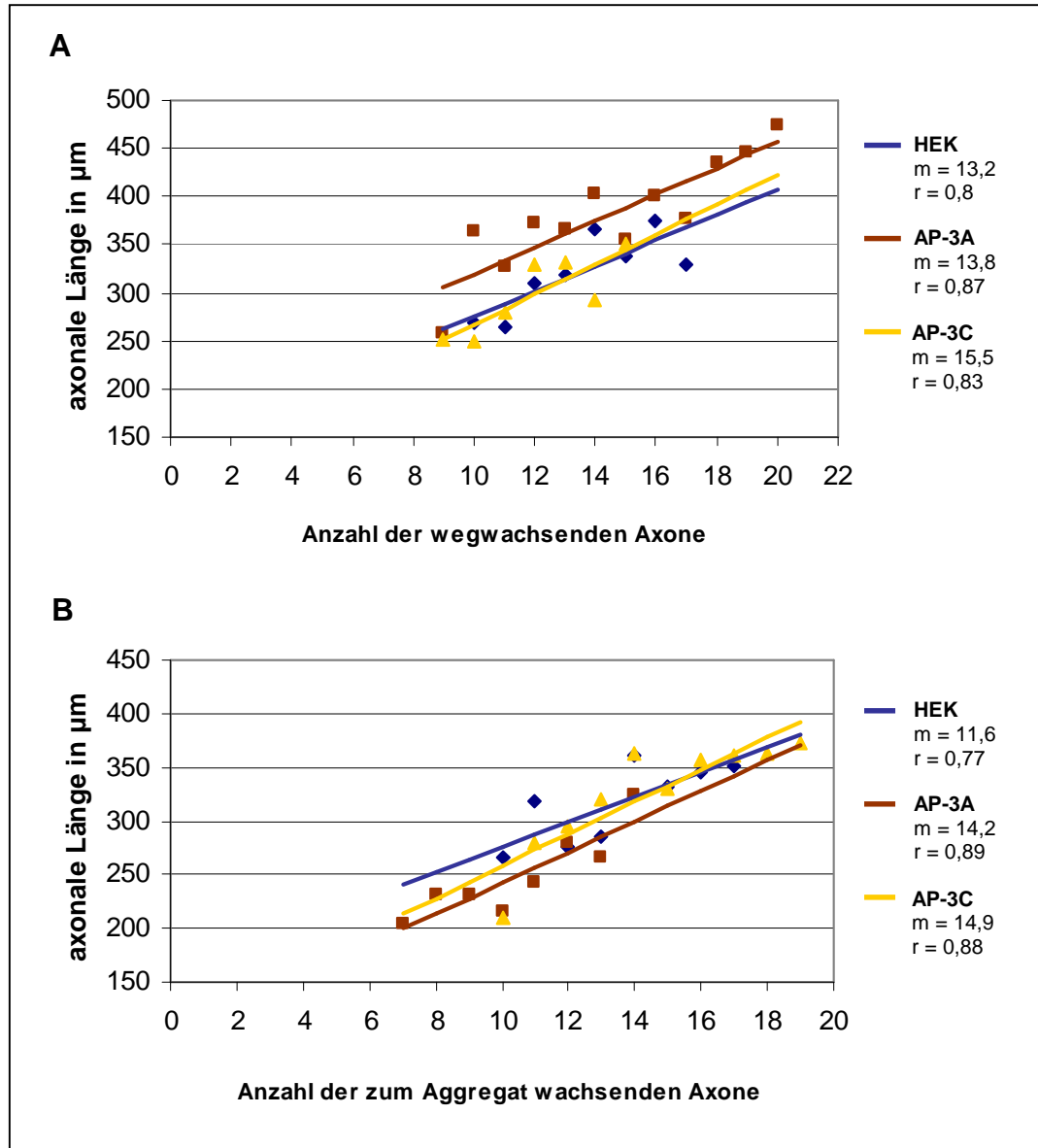
## Abnehmende Semaphorin-Gradienten

Ganz anders verhalten sich Axone, wenn sie von den Semaphorin-Gradienten wegwachsen. Von einem AP-3A-Zellaggregat abgewandte cortikale Axone wuchsen vergleichsweise zum Kontrollexperiment um 30% vermehrt vom Zellaggregat weg. Darüber hinaus waren diese cortikalen Fasern ca. 30% länger als unter neutralen Bedingungen. Dagegen wuchsen bei AP-3C-Zellaggregaten genauso viele Axone aus, wie im Kontrollexperiment. Diese Axone waren nur wenig kürzer als die Kontrolle.

Um das Wachstumsverhalten der cortikalen Axone in abnehmenden Semaphorin-Gradienten näher zu analysieren, wurden die cortikalen Explantate nach Anzahl der wegwachsenden Axone gruppiert und die jeweiligen Axonlängen gemittelt. In einem Diagramm wurde dann die Anzahl der vom Aggregat wegwachsenden Axone gegen die Mittelwerte der axonalen Länge aufgetragen. Aus Abb. 4.6 A) wird ersichtlich, dass unabhängig von der experimentiellen Situation, die Axone umso länger waren, je mehr Axone aus den Explantaten auswuchsen. Dies scheint ein genereller Effekt der Explantatkultur zu sein. Da die Werte der Korrelationskoeffizienten  $r$  bei allen Regressionsgeraden um 0,8 lagen, bestand ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Axonanzahl und Axonlänge. Die statistische Analyse der Regressionsgeraden mittels „Test der Regressionskoeffizienten“ ergab, dass sich die Anstiege ( $m$ ) der Geraden statistisch nicht unterschieden. Sie lagen bei den wegwachsenden Axonen zwischen 13,2 und 15,5 und bei den zum Aggregat wachsenden Axonen zwischen 11,6 und 14,9. Ein Anstieg von 13 bedeutet, dass bei Erhöhung der Axonanzahl um 1 die Axonlänge um 13  $\mu\text{m}$  zunimmt. Wie bereits bemerkt waren folglich Axone, die in Richtung abnehmender Sema3A-Gradienten wuchsen, deutlich länger als Axone in abnehmenden Sema3C-Gradienten und unter Kontrollbedingungen. Dies wird dadurch ersichtlich, dass die Regressionsgerade für die 3A-Zellaggregate weit über denen von 3C und der Kontrolle liegt. Da die Regressionsgeraden von 3C und der Kontrolle nahezu identisch sind, unterscheiden sich die Axonlängen in diesen abnehmenden Gradienten nicht voneinander. Dennoch war allen drei experimentiellen Ansätzen die positive Korrelation zwischen steigender Axonanzahl und steigender Axonlänge gemein.

Um zu überprüfen, ob diese Korrelation zwischen Axonanzahl und Axonlänge auch bei den zunehmenden Semaphorin-Gradienten bestand, wurde mit den zu den Aggregaten wachsenden Axonen analog verfahren und ein Diagramm erstellt (Abb. 4.6 B). Wieder nimmt mit steigender Axonanzahl die Länge der Axone unter Kontrollbedingungen sowie unter Sema3A- und Sema3C-Einfluss zu. Die statistische Analyse ergab außerdem, dass sich die Anstiege der Regressionsgeraden nicht unterschieden. Die Regressionsgerade von Axonen die auf AP-3C-Aggregate zu wachsen ist fast identisch mit der Kontrolle. Dagegen liegt die

Regressionsgerade für AP-3A-Aggregate unter der von AP-3C und der Kontrolle. Somit sind diese Axone generell kürzer als Axone unter Kontrollbedingungen.



**Abb. 4.6: Quantitative Analyse der Co-Kultur-Experimente.** Alle Explantate mit der entsprechenden Anzahl wegwachsender bzw. zum Aggregat wachsender Axone wurden in die quantitative Analyse einbezogen und die axonalen Längen gemittelt. Die Steigung  $m$  der Regressionsgeraden sowie die jeweiligen Korrelationskoeffizienten  $r$  sind im rechten Teil der Diagramme zu finden. Werte für  $r$  nahe +1 deuten auf einen positiven linearen Zusammenhang hin. **A):** Quantitative Analyse der Länge von Axonen, die von den Zellaggregaten wegwuchsen. Unabhängig vom verwendeten Zellaggregat stieg die axonale Länge mit der Anzahl der vom Explantat ausgewachsenen Axone. Die Werte der Längen der Axone, die von einem AP-3A-Zellaggregat wegwuchsen, lagen über denen von HEK und AP-3C. **B):** Quantitative Analyse der axonalen Länge von Fasern, die in Richtung der Zellaggregate wuchsen. Die in Richtung eines AP-3A-Zellaggregates wachsenden Axone waren aufgrund der repulsiven Eigenschaft des Sema3A am kürzesten.

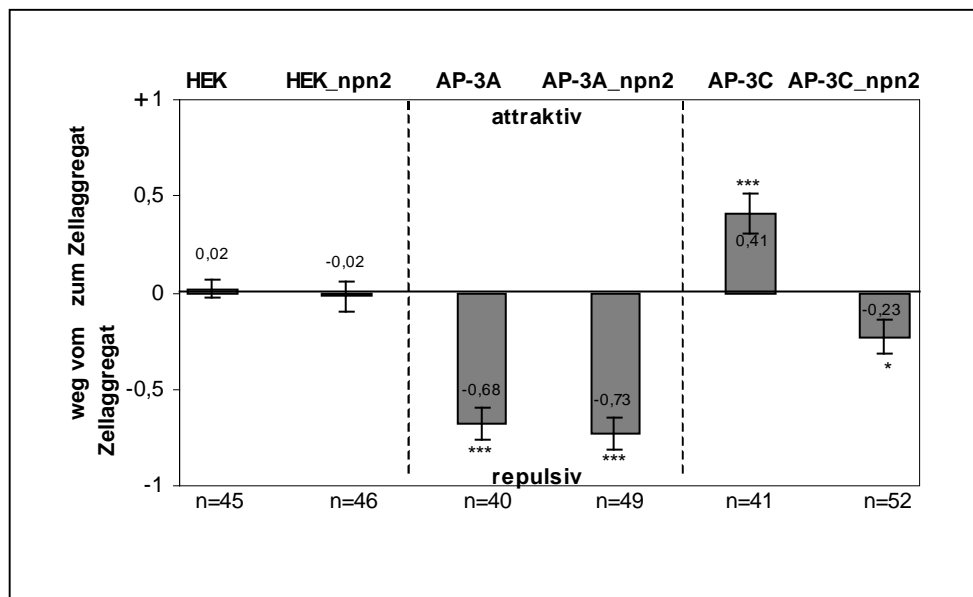
## **Neuropilin 2 vermittelt die durch Semaphorin 3C-induzierte Attraktivität auf cortikale Axone**

Um eine mögliche Beteiligung des Semaphorin-Rezeptors Neuropilin 2 in den Co-Kultur-Experimenten zu untersuchen, wurde den Co-Kulturen ein funktionell blockierender Antikörper gegen Neuropilin 2 zugesetzt. Die Neuropiline fungieren bei den Klasse-3-Semaphorinen als Co-Rezeptoren und dienen der Ligandenbindung. Der Co-Rezeptor Neuropilin 1 bindet mit hoher Affinität Sema3A, wo hingegen Sema3C von Neuropilin 1 und Neuropilin 2 gebunden wird (He et al., 2002; Kruger et al., 2005). Ziel des Versuches war es, durch Blockierung der Sema3C-Bindung mit dem funktionell blockierenden Antikörper gegen Neuropilin 2, Auswirkungen auf den durch Sema3C verursachten attraktiven Effekt auf auswachsende cortikale Axone zu untersuchen. Das Wachstumsverhalten der corticalen Axone wurde dann in Gegenwart von HEK-, AP-3A- und AP-3C-Zellaggregaten getestet. Entsprechend dem Wachstumsverhalten der corticalen Axone wurden pro Explantat die Nummern 0; -1 oder +1 vergeben und verrechnet (siehe Material und Methoden). Attraktives Wachstumsverhalten der Axone ergibt demnach positive Werte, und repulsives Wachstumsverhalten negative Werte. Das Diagramm in Abb. 4.7 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

In Anwesenheit von Zellaggregaten der Kontrollzelllinie HEK wuchsen die corticalen Axone gleichmäßig aus den Explantaten aus. Auch unter Zugabe des Neuropilin 2-Antikörpers war keine Präferenz der Fasern in Richtung des HEK-Zellaggregates oder vom Zellaggregat weg zu beobachten.

Ein AP-3A-Zellaggregat bewirkte, dass die Axone vermindert in Richtung der Sema3A-Quelle wuchsen. Der gleiche repulsive Sema3A-Effekt wurde auch bei Blockierung von Neuropilin 2 durch den Antikörper beobachtet. Wie zu erwarten, hat die Inhibition der Sema3C-Bindestelle keinen Einfluss auf den repulsiven Sema3A-Effekt corticaler Axone.

Wurde hingegen in Anwesenheit eines AP-3C-Zellaggregates der Neuropilin 2–Co-Rezeptor blockiert, so wendeten sich die corticalen Axone zunehmend von der Sema3C-Quelle ab. Ohne Zugabe des Neuropilin 2-Antikörpers wuchsen dagegen die Fasern, wie bereits beschrieben, bevorzugt in Richtung des AP-3C-Zellaggregates. Der attraktive Effekt von Sema3C wurde durch die Blockierung einer Sema3C-Bindestelle mit dem Neuropilin 2-Antikörper also nicht nur aufgehoben, sondern in ein repulsives Signal konvertiert. Neuropilin 2 ist aus diesem Grund als essentieller Bestandteil des Sema3C–Rezeptorkomplexes einzustufen, da bei dessen Blockierung anstelle einer attraktiven eine repulsive Reaktion der corticalen Axone auf Sema3C erfolgt.



**Abb. 4.7: Quantitative Analyse der Co-Kultur-Experimente mit anti-Neuropilin 2.** Die Blockierung der Neuropilin 2-Rezeptoren durch einen Antikörper bewirkte, dass cortikale Axone von einer Sema3C-Quelle vermehrt weg wuchsen. Somit wurde das attraktive Wachstumsverhalten der Axone in Gegenwart von Sema3C in ein repulsives Wachstumsverhalten umgewandelt. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt: \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , \* =  $p \leq 0,05$ . n = Anzahl der analysierten Explantate; npn2 = anti-Neuropilin 2.

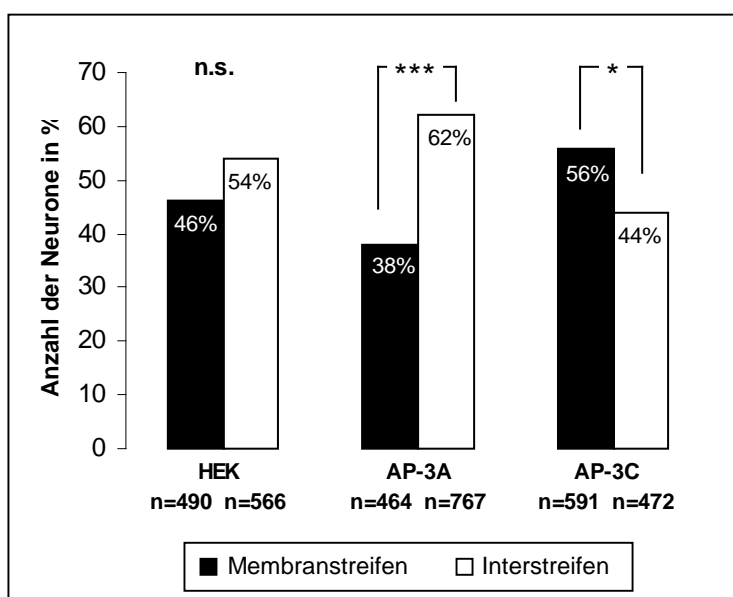
#### 4.2.3. Der Einfluss von membrangebundenen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone von Einzelzellen

Mit den in den Streifenassays und in den Co-Kultur-Experimenten dargestellten Ergebnissen, konnten bereits Aussagen über die grundlegenden Effekte von membrangebundenen und löslichen Sema3A und Sema3C gewonnen werden. Sema3A wirkte demnach repulsiv und Sema3C attraktiv auf auswachsende cortikale Axone. Wie aber würden sich cortikale Axone auf graduell verteilten Semaphorin-Membranen verhalten? Und wie würden sich der attraktive bzw. repulsive Effekt auf die auswachsenden Axone äußern? Dazu wurden einzelne cortikale Neurone am Embryonaltag 15 präpariert und auf den Streifengradienten für 24 h kultiviert. Für die Herstellung der Membranen wurden die Zelllinien AP-3A, AP-3C und als Kontrolle HEK verwendet. Analysiert wurden die Verteilung der Neurone in den Inter- und Membranstreifen, die Orientierung der ausgewachsenen Axone und Dendriten im Membrangradienten sowie die Länge der Fasern.

### Cortikale Neurone meiden die Semaphorin 3A-Streifen, dagegen zeigen sie für die Semaphorin 3C-Streifen eine leichte Präferenz

Abb. 4.8 macht im Hinblick auf die Kontrollexperimente mit den HEK-Zellen deutlich, dass die Zellkörper der corticalen Neurone scheinbar eine leichte Präferenz für die Interstreifen als Wachstumssubstrat aufwiesen. 54% der Neurone wuchsen in den Interstreifen mit Laminin-Poly-L-Lysin-Beschichtung; 46% der corticalen Zellen fanden sich auf den HEK-Membranstreifen. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Bei den Sema3A-Gradienten war hingegen eine deutliche Präferenz der corticalen Neurone für die membranfreien Interstreifen zu vermerken. Die Mehrzahl der Zellen (62%) vermieden Sema3A-haltigen Membranstreifen, und wuchsen in den Interstreifen. Ein signifikanter Unterschied bestand damit zu der Zellzahl in den Sema3A-Membranstreifen, dort waren nur 38% der Zellen lokalisiert.

Ein grundsätzlich anderes Wachstumsverhalten war in den Sema3C-Membrangradienten zu beobachten. 56% der corticalen Neurone wuchsen in den Membranstreifen und 44% der Zellen in den Interstreifen. Hier war also ein geringer Unterschied zwischen der Neuronanzahl auf den Inter- bzw. Membranstreifen zu vermerken, der aber statistisch signifikant war. Somit wuchsen die corticalen Neurone bevorzugt auf den Sema3C-haltigen Membranstreifen. Der Vergleich mit dem Kontrollexperiment macht deutlich, dass die semaphorinhaltigen Membrangradienten zwei grundlegend verschiedene Effekte auf die corticalen Neurone hatten. Da weniger Neurone auf den Sema3A-Membranstreifen zu finden waren, schien von den Membranstreifen ein inhibitorischer Effekt auf die corticalen Neurone auszugehen. Die Sema3C-Membranen andererseits hatten einen positiven Einfluss auf die corticalen Zellen, da die Neurone vermehrt auf den Membranstreifen lokalisiert waren.



**Abb. 4.8: Quantitative Analyse der Neuronenanzahl auf den Inter- und Membranstreifen.**

Im Kontrollexperiment zeigten die corticalen Neurone eine leichte Präferenz für die Interstreifen. Im Falle der Sema3A-Membrangradienten vermieden die Neurone die Sema3A-Membranen. Dagegen bevorzugte die Mehrzahl der corticalen Neurone die Sema3C-Membranen (56%). Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Neurone; n.s. = signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \* =  $p \leq 0,01$ .

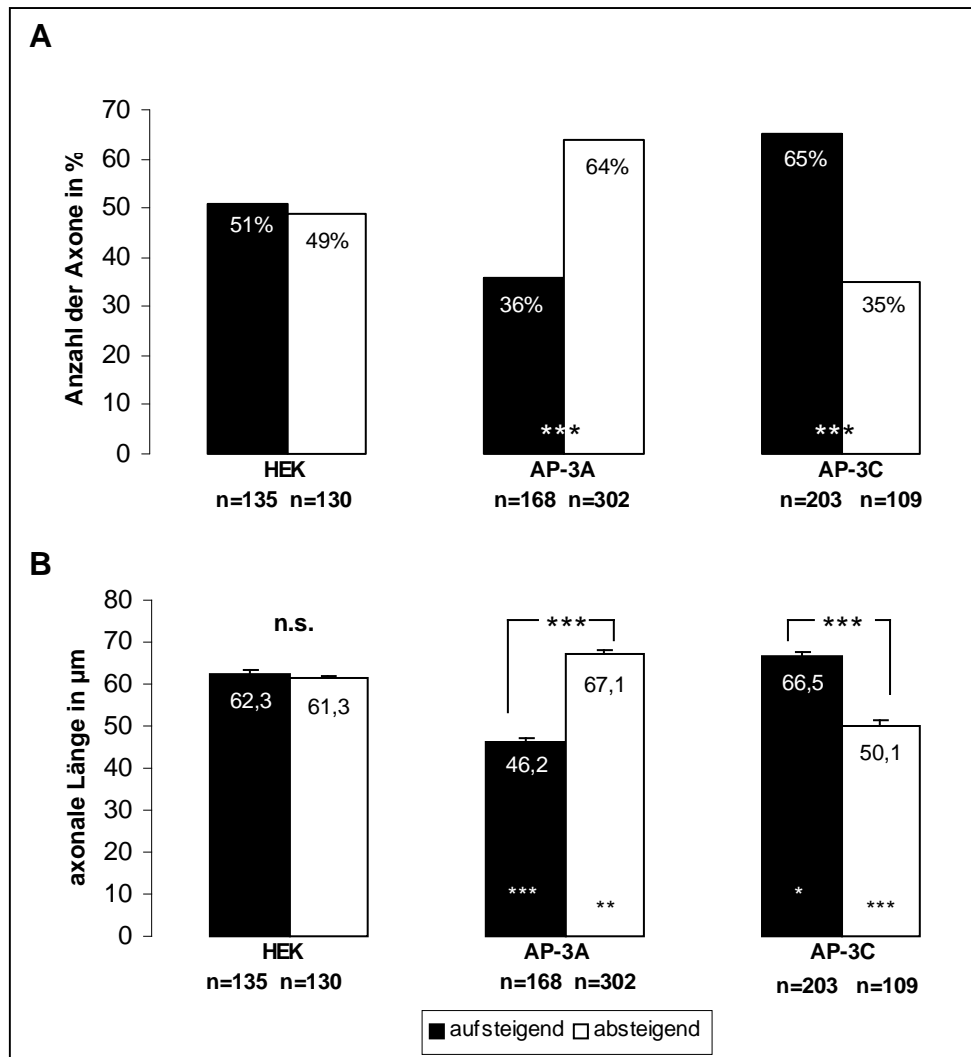
## In semaphorinhaltigen Membrangradienten zeigen cortikale Axone Orientierungspräferenzen

Abb. 4.9 zeigt die Analyse der Orientierung der Axone (A) sowie der Axonlänge (B) in den verschiedenen Membrangradienten. Auf einem Kontrollgradient aus Membranen der HEK-Zellen wuchsen 51% der cortikalen Axone in Richtung zunehmender Membrankonzentration (aufsteigend) und 49% in Richtung abnehmender Membrankonzentration (absteigend). Die Länge der cortikalen Axone variierte nicht im Membrangradienten. Axone, die sich in Richtung der aufsteigenden HEK-Membrangradienten orientierten, waren ca. 62  $\mu\text{m}$  lang. Axone, in Richtung der absteigenden Gradienten, erreichten eine Länge von rund 61  $\mu\text{m}$ . Ein HEK-Membrangradient hatte somit keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Axonen.

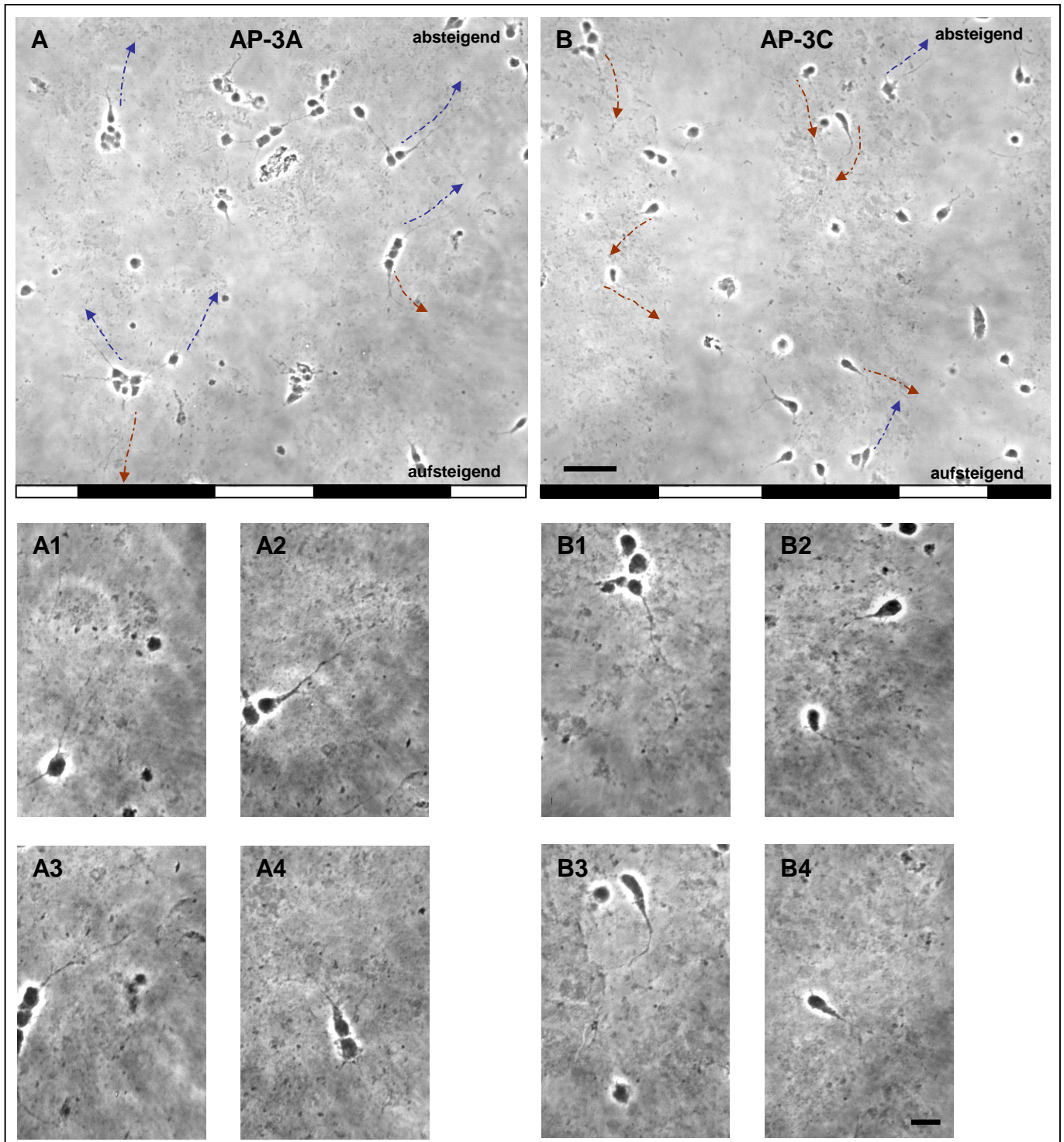
Wurden dagegen cortikale Neurone auf Semaphorin-Membrangradienten kultiviert, so war eine vom jeweiligen Semaphorin abhängige Orientierungspräferenz der auswachsenden Axone ersichtlich. Abb. 4.10 A) und B) zeigen dazu jeweils einen Ausschnitt aus einem AP-3A- und AP-3C-Membrangradienten. Es ist deutlich zu sehen, dass sich auf einem Sema3A-Membrangradient die Mehrzahl der Axone in Richtung abnehmender Membrankonzentration orientierte (Abb. 4.10 A). Auf einem Sema3C-Membrangradienten wuchsen die Axone hingegen bevorzugt zur zunehmenden Semaphorin-Konzentration (Abb. 4.10 B). Auf beiden Semaphorin-Gradienten sind auch Axone sichtbar, die nicht die bevorzugte Wachstumsrichtung einschlugen. Diese Axone sind allerdings in der Minderheit.

Die detaillierte Analyse der Membrangradienten (Abb. 4.9) ergab, dass auf Sema3A-Gradienten fast zwei Drittel der cortikalen Axone in Richtung der absteigenden Gradienten wuchsen. 36% der ausgewachsenen Fasern orientierten sich dagegen zur aufsteigenden Sema3A-Membrankonzentration. Die Orientierungspräferenzen der Axone in einem Sema3A-Gradienten unterschied sich signifikant von der Kontrollsituation. Nicht nur in der Wachstumsrichtung bestand ein Unterschied im Gradienten, sondern auch in der Axonlänge. Axone, die in Richtung zunehmender Sema3A-Membrankonzentration wuchsen, waren im Mittel 46  $\mu\text{m}$  lang und somit signifikant kürzer als Axone, die sich in Richtung abnehmender Membrankonzentration orientierten. Sie wiesen eine Länge von ca. 67  $\mu\text{m}$  auf.





**Abb. 4.9: Quantitative Analyse der Orientierungspräferenz (A) und der Länge der Axone (B) auf Sema3A- und Sema3C-Membrangradienten.** Auf einem Sema3A-Gradienten orientierte sich die Mehrzahl der auswachsenden kortikalen Axone zur absteigenden Membrankonzentration; auf einem Sema3C-Gradienten dagegen in Richtung aufsteigender Konzentration. Eine signifikante Erhöhung der axonalen Länge war ein Merkmal der bevorzugten Wachstumsrichtung. Die statistische Analyse der Axonanzahl wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests, und die der Axonlänge mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten kortikalen Neurone; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \*\* =  $p \leq 0,001$ ; \* =  $p \leq 0,01$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.



**Abb. 4.10: Phasenkontrast-Aufnahmen von Sema3A- (A) und Sema3C-Membrangradienten (B).** A) und B): Die Membrankonzentration der Gradienten nimmt von oben nach unten zu. Die ausgewachsenen Axone der corticalen Neurone sind zusätzlich mit einem Pfeil in ihrer Wachstumsrichtung markiert. Um die Membranstreifen besser nachvollziehen zu können, sind diese unter den jeweiligen Photos markiert: Schwarz = Membranstreifen und Weiß = Interstreifen. Es ist auffällig, dass sich die Mehrzahl der corticalen Axone in einem Sema3A-Gradienten zur abnehmenden Membrankonzentration orientieren (A). In einem Sema3C-Membrangradienten wuchsen sie corticalen Axone vorrangig in Richtung zunehmender Membrankonzentrationen (B). Balken: 50  $\mu\text{m}$ . Die Bildserien A1 bis A4 sowie B1 bis B4 zeigen nochmals einige der corticalen Axone der Sema3A- und Sema3C-Membrangradienten aus A) und B) in höherer Vergrößerung. Balken: 10  $\mu\text{m}$ .

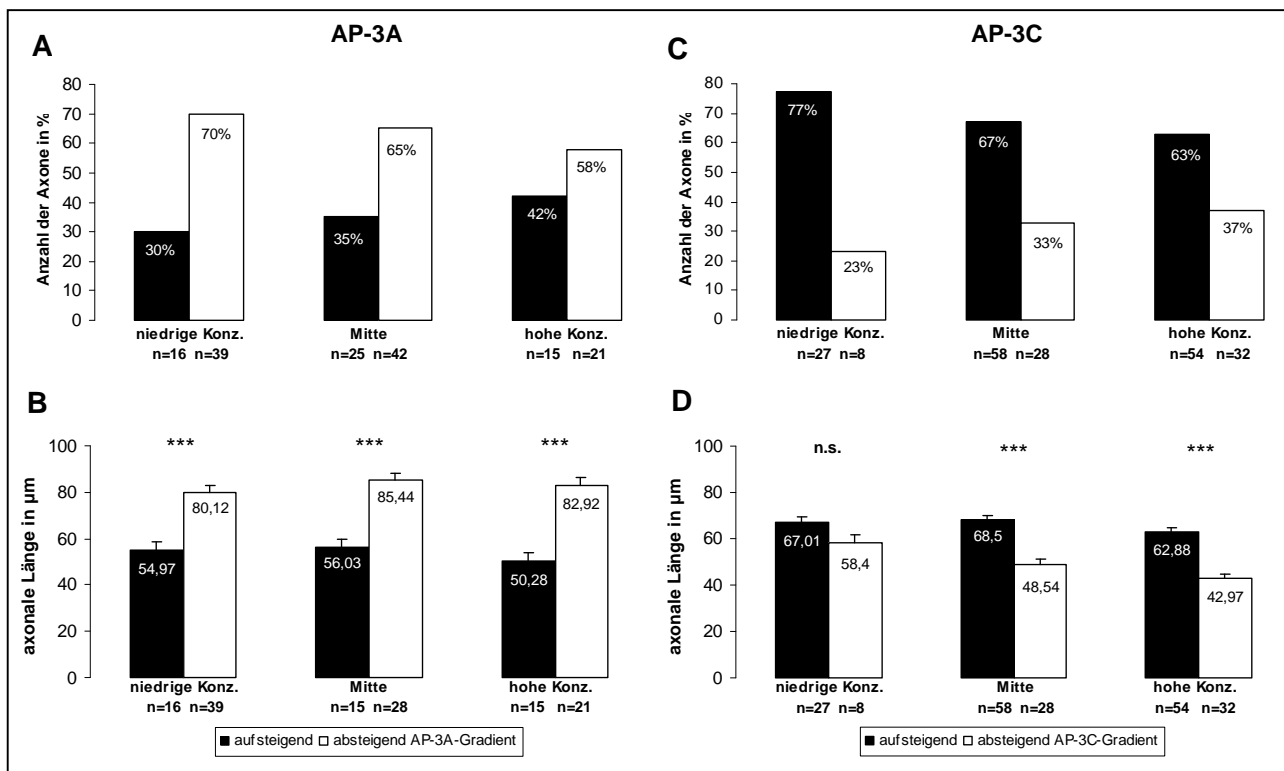
Auf Sema3C-Membrangradienten (Abb. 4.9) wuchsen 65% der Axone zur zunehmenden Membrankonzentration und 35% zur abnehmenden Membrankonzentration. Auch diese Orientierungspräferenzen waren zur Kontrollsituation statistisch signifikant verschieden. Die kortikalen Axone im Sema3C-Gradienten zeigten somit ein gegensätzliches Orientierungsverhalten zu Axonen in Sema3A-Gradienten. Die Fasern, die in Richtung des aufsteigenden Sema3C-Gradienten wuchsen, waren signifikant länger (66,5  $\mu\text{m}$ ) als Fasern, die zum absteigenden AP-3C-Membrangradienten wuchsen (50,1  $\mu\text{m}$ ).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich auswachsende cortikale Axone in einem Sema3A-Membrangradienten bevorzugt zur niederen Membrankonzentration orientieren; in einem Sema3C-Membrangradienten dagegen zur höheren Membrankonzentration. Die bevorzugte Wachstumsrichtung der kortikalen Axone auf den Semaphorin-Membrangradienten war auch durch eine signifikante Erhöhung der axonalen Länge gekennzeichnet. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Sema3A einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstumsverhalten kortikaler Axone hat, Sema3C dagegen das axonale Wachstum positiv beeinflusst.

### **Verschiedene Semaphorin-Konzentrationen im Gradienten haben stets den gleichen Effekt auf die Orientierung und Länge der Axone**

Um zu analysieren, ob der durch Sema3A- oder Sema3C-vermittelte Effekt auf cortikale Axone von der absoluten Membrankonzentration im Gradienten in seiner Intensität moduliert wurde, wurde der Membrangradient in drei Bereiche aufgeteilt: 1. einen Bereich mit niedriger Membrankonzentration, 2. einen mittleren Bereich und 3. einen Bereich mit hoher Membrankonzentration. Da ein Streifengradient ca. 9 mm lang war, nahm somit jeder der drei eingeteilten Bereiche ca. 3 mm ein, wobei die Partikelanzahl vom 1. bis zum 3. Bereich zunahm. So fanden sich beispielsweise im AP-3A\_3-Gradienten im dritten Bereich mehr als doppelt so viele Membranpartikel als im ersten Bereich (siehe Abb. 3.2 im Material und Methoden-Teil). Die Analyse von zwei Membrangradienten AP-3A und AP-3C in den drei unterschiedlichen Bereichen ist in Abb. 4.11 wiedergegeben. In allen drei Bereichen der Sema3A-Gradienten sowie der Sema3C-Gradienten zeigten die ausgewachsenen kortikalen Axone die zu erwartende Orientierungspräferenz. In einem Sema3A-Membrangradienten wuchs die Mehrzahl der kortikalen Axone in Richtung des absteigenden Gradienten. Im Gegensatz dazu orientierte sich die Majorität der Axone in einem Sema3C-Membrangradienten in Richtung des aufsteigenden Gradienten. Im 1. Bereich der Sema3A-Gradienten orientierten sich 70% der Axone zum absteigenden Gradienten; im mittleren Bereich waren es noch 65% und im 3. Bereich 58% der Axone (Abb. 4.11 A). Ähnlich verhielt es sich in Sema3C-Membrangradienten; 77% der ausgewachsenen kortikalen Axone wuchsen im 1. Bereich der Gradienten in Richtung zunehmender Membrankonzentration. Im

2. (67%) und im 3. Bereich (63%) nahm der Anteil der Fasern, die sich zur zunehmenden Membrankonzentration orientierten, dann ab (Abb. 4.11 C). Zwar war bei niedrigen Sema3A- und Sema3C-Konzentrationen der stärkste Orientierungseffekt auf cortikale Axone zu beobachten, d.h. dass sich die meisten Axone wuchsen entsprechend ihrer Orientierungspräferenz aus, das Verhältnis zu den anderen 2 Bereichen des Gradienten war aber nicht signifikant verschieden. Somit war die Ausprägung des Orientierungseffektes der corticalen Axone nicht von der jeweiligen Semaphorin-Konzentration im Gradienten abhängig, sondern war in allen 3 Bereichen des Gradienten gleich.



**Abb. 4.11: Quantitative Analyse der Membrangradienten im absteigenden, mittleren und aufsteigenden Bereich. A) und B): Sema3A-Gradient:** Die ausgewachsenen corticalen Fasern orientierten sich bevorzugt in allen drei Bereichen der Sema3A-Gradienten zur absteigenden Seite. Im Weiteren waren diese Axone länger, als Axone, die sich zur aufsteigenden Seite orientierten. **C) und D): Sema3C-Gradient:** Die bevorzugte Seite der ausgewachsenen corticalen Axone auf den Sema3C-Gradienten war in allen drei Bereichen die Aufsteigende. Fasern, die in Richtung aufsteigender Sema3C-Gradienten wuchsen, waren länger als andere Fasern. Der prozentuale Anteil der Axone in den Sema3A- und Sema3C-Gradienten, die sich entsprechend ihrer Orientierungspräferenz orientierten war im 1. Bereich mit der niedrigsten Membrankonzentration am größten. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten corticalen Neurone; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ .

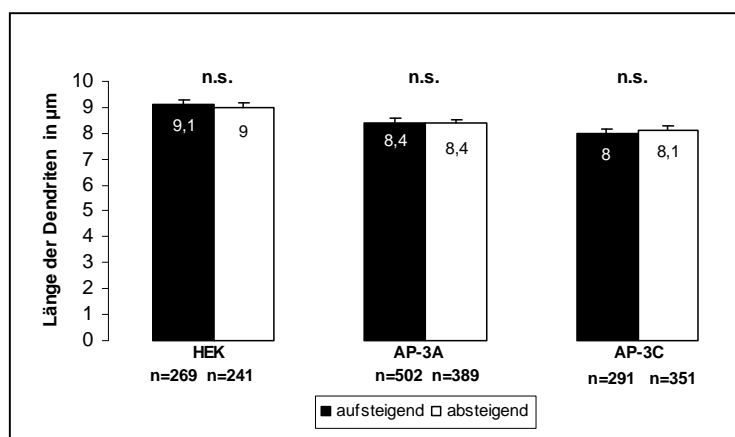
Die Analyse der axonalen Länge der Fasern in einem Sema3A-Gradienten erbrachte in den drei Bereichen übereinstimmende Ergebnisse. Axone, die in Richtung der absteigenden Sema3A-Gradienten wuchsen, waren signifikant länger als Axone, die in Richtung der aufsteigenden Gradienten wuchsen (Abb. 4.11 B). Ähnliche Ergebnisse zeigte die

Untersuchung der Axonlänge in einem Sema3C-Gradienten. Fasern, die zur höheren Membrankonzentration wuchsen, waren länger als Fasern, die zur niederen Membrankonzentration wuchsen (Abb. 4.11 D). Mit Ausnahme des 1. Bereichs bestand stets ein signifikanter Unterschied zwischen den Axonlängen in beide Richtungen. Dass Axone im 1. Bereich des Sema3C-Gradienten in der bevorzugten Wachstumsrichtung nur tendenziell länger sind, könnte auf die geringe Anzahl vermessener Axone zurückzuführen sein.

### Semaphorin-Membrangradienten haben keinen Einfluss auf das dendritische Wachstumsverhalten

Neben den axonalen Fortsätzen wurden auch die Orientierung und Länge der ausgewachsenen Dendriten im jeweiligen Membrangradienten analysiert. Die Dendriten zeigten im Vergleich zu den kortikalen Axonen keine bevorzugte Wachstumsrichtung auf den graduell verteilten semaphorinhaltigen Membranen. Die kortikalen Dendriten wuchsen also unabhängig von der Konzentration der jeweiligen vorliegenden Membranart aus (nicht grafisch dargestellt). Die Analyse der Länge der ausgewachsenen Dendriten erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollmembranen sowie Sema3A- und Sema3C-Membranen (Abb. 4.12).

Auf einem HEK-Kontrollgradient waren die kortikalen Dendriten unabhängig von der Richtung des Membrangradienten im Mittel 9  $\mu\text{m}$  lang. Im Falle der semaphorinhaltigen Membrangradienten waren die Dendriten nur minimal kürzer: Sema3A-Membrangradient: 8,4  $\mu\text{m}$  und Sema3C-Membrangradient: 8  $\mu\text{m}$ . Semaphorinhaltige Membrangradienten beeinflussten somit weder die Richtung der auswachsenden kortikalen Dendriten, noch deren Länge.



**Abb. 4.12: Quantitative Analyse der Länge der ausgewachsenen Dendriten in Membrangradienten.** Die kortikalen Dendriten zeigten keine Orientierungspräferenz in den Kontroll- und semaphorinhaltigen Membrangradienten. Die Länge der Dendriten wich in den verschiedenen Membrangradienten nicht voneinander ab. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Dendriten; n.s. = nicht signifikant.

### **4.3. Der Einfluss einer Mischung von Semaphorin 3A und Semaphorin 3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone *in vitro***

Alle bisherigen *in-vitro*-Experimente waren so konzipiert, dass jeweils der Einfluss nur eines Semaphorins auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Fasern getestet wurde. Sie belegten den repulsiven Effekt von Sema3A sowie den attraktiven Einfluss von Sema3C auf die cortikalen Axone. Da aber Sema3A und Sema3C im embryonalen Cortex gleichzeitig exprimiert werden (Vergleich Einleitung 1.5.4.), war daher der kombinierte Einfluss von Sema3A und Sema3C auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Axonen von besonderem Interesse. So wurden die in diesem Abschnitt aufgeführten *in-vitro*-Daten u.a. unter Verwendung der semaphorinhaltigen Zelllinien Sema3C\_3A und Sema3C\_3a erhalten. Beide Semaphorin-Zelllinien exprimierten und sezernierten sowohl Sema3A als auch Sema3C in unterschiedlichen Konzentrationen. Beiden Zellgemischen war gemeinsam, dass ca. 70% der Zellen Sema3C exprimierten. Im Sema3A-Gehalt hingegen unterschieden sich die beiden Zelllinien: 30% der Zellen der Sema3C\_3A-Zelllinie exprimierten Sema3A. Bei der Sema3C\_3a-Zelllinie waren es dagegen nur 20% der Zellen, die Sema3A exprimierten. Somit standen 2 Zelllinien mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an Sema3A und 3C zur Verfügung.

#### **4.3.1. Effekte von Membranismischungen aus Semaphorin 3A und 3C auf cortikale Axone**

Die für den Streifenassay benötigten Membranen wurden aus den Zelllinien HEK, Sema3C\_3A und Sema3C\_3a gewonnen. Gegenstand der Analyse waren die Anzahl und die Länge, der auf Inter- und Membranstreifen ausgewachsenen Axone. Die quantitative Analyse der Streifenexperimente mit den Semaphorinmembranen ist in Abb. 4.13 dargestellt.

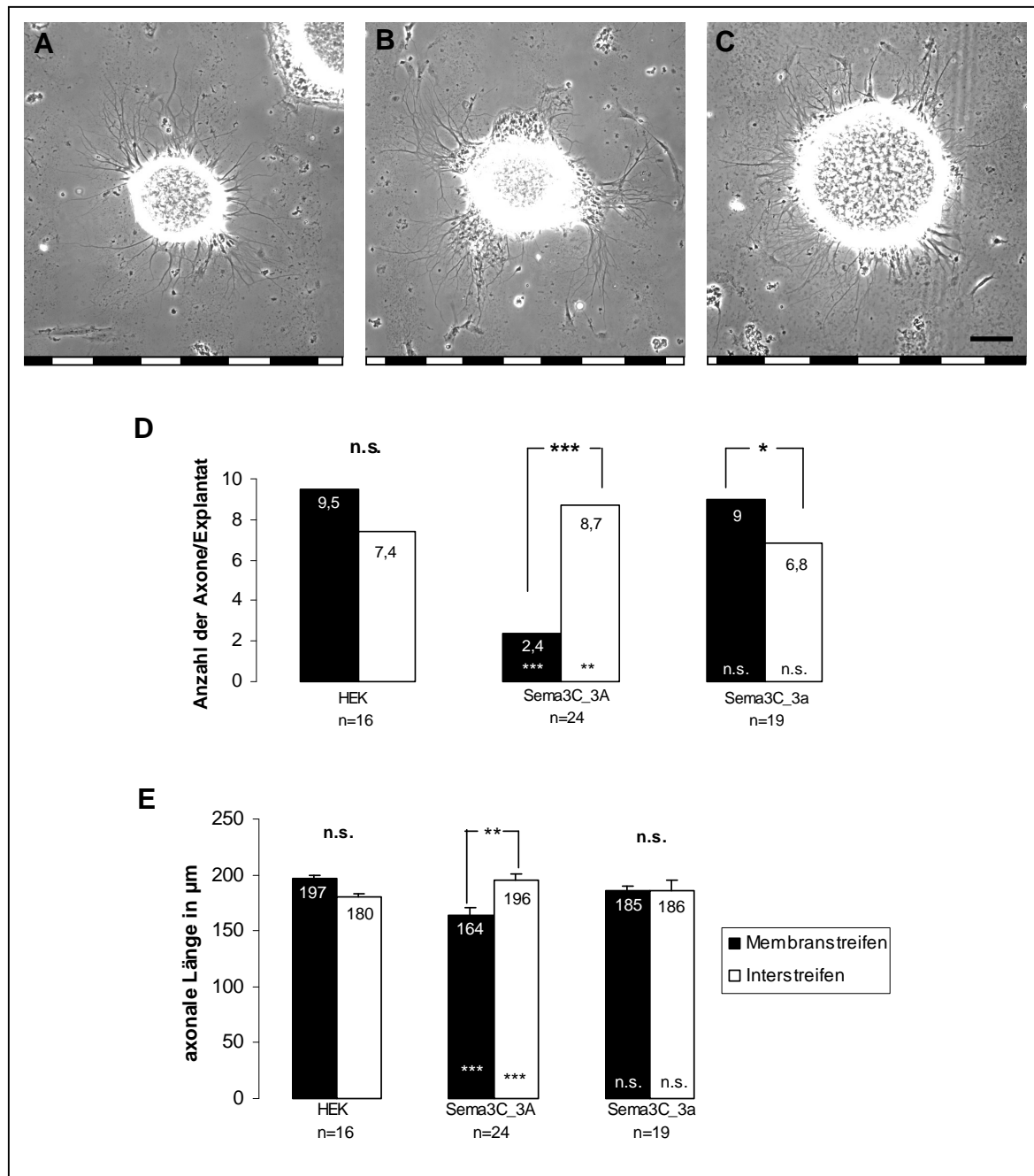
Ähnlich zu den bereits dargestellten Ergebnissen der Streifenexperimente mit den AP-Zellen, wuchsen die cortikalen Axone gleichermaßen auf Laminin-Poly-L-Lysin-Streifen und HEK-Membranstreifen. Demnach waren die HEK-Membranen kein bevorzugtes Wachstumssubstrat für cortikale Axone.

### **Ein 30%-iger Semaphorin 3A-Membrananteil verursacht inhibitorische Effekte auf cortikale Axone**

Wurden cortikale Explantate in einem Streifenassay, der Sema3C\_3A-Membranen enthielt, *in vitro* kultiviert, so war eine eindeutige Präferenz der auswachsenden cortikalen Axone für die Interstreifen zu beobachten. Im Durchschnitt wuchsen 9 Axone pro Explantat auf den Interstreifen und 2 Axone auf den Membranstreifen, die sich zu 70% aus Sema3C- und zu 30% aus Sema3A-Membranpartikeln zusammensetzte. Die auf den Interstreifen auswachsenden cortikalen Axone waren mit 196  $\mu\text{m}$  signifikant länger, als Axone auf den Membranstreifen (164  $\mu\text{m}$ ). Da ca. viermal weniger Axone auf den Sema3C\_3A-Membranstreifen auswuchsen, und diese Axone noch zusätzlich signifikant kürzer waren, ist es offensichtlich, dass die Sema3C\_3A-Membranen einen inhibitorischen Einfluss auf die cortikalen Axone hatten.

Ganz anders war das Wachstumsverhalten der cortikalen Fasern auf Sema3C\_3a-Membranen, die nur zu 20% Sema3A beinhalten. Im Mittel wuchsen 9 Axone pro Explantat auf den Membranstreifen und 7 Axone auf den Interstreifen. Die cortikalen Axone wuchsen also vermehrt auf den Membranstreifen, da zwischen der Axonanzahl auf Membran- und Interstreifen ein geringer signifikanter Unterschied bestand. Die axonale Länge, der auf den beiden angebotenen Substraten ausgewachsenen Axone, unterschied sich dagegen nicht. Die Fasern wiesen eine mittlere Länge von 185  $\mu\text{m}$  bzw. 186  $\mu\text{m}$  auf. Obwohl die auswachsenden Axone eine leichte Präferenz für die Sema3C\_3a-Membranen zeigten, hatten diese keinen Einfluss auf die Axonlänge.

Der Vergleich der Interstreifen in den verschiedenen Streifenassays zeigte, dass ungefähr gleich viele Axone auf den Interstreifen wuchsen. Im Falle der Sema3C\_3A-Streifenassays war die Anzahl der Axone in den Interstreifen im Vergleich zur Kontrolle nur leicht, aber signifikant erhöht. Auch waren die Fasern in den Interstreifen der Sema3C\_3A-Streifenassays länger als Fasern in den Interstreifen des Kontrollexperimentes. Diese Variation in der Axonanzahl und Axonlänge auf den Laminin-Poly-L-Lysin-Streifen verschiedener Streifenassays war wohl in der relativ geringen Anzahl analysierter Explantate begründet. Axone in den Interstreifen der Sema3C\_3a-Streifenassays waren hinsichtlich der Axonanzahl und der Axonlänge nicht von den Interstreifen im Kontrollexperiment verschieden. Anders war dagegen das Wachstumsverhalten in den Sema3C\_3A-Membranstreifen. Dort wuchsen etwa viermal weniger Axone, als in den HEK-Membranstreifen. Außerdem waren die Axone, die auf einer Membranismischung von 70% Sema3C und 30% Sema3A wuchsen, signifikant kürzer als die Kontrolle. Cortikale Axone, die dagegen bei gleichem Sema3C-Gehalt auf Membranen mit nur 20% Sema3A-Anteil wuchsen, hatten vergleichsweise zur Kontrolle eine analoge axonale Länge.



**Abb. 4.13: Quantitative Analyse der Streifenassays. A) bis C):** Fotografische Aufnahmen von corticalen Explantaten der Streifenassays: A) Kontrolle mit HEK-Membranen; B) Sema3C\_3A-Membranen und C) Sema3C\_3a-Membranen. Balken: 100 µm. **D):** Quantitative Analyse der Anzahl der Axone pro Explantat. **E):** Quantitative Analyse der axonalen Länge. Die Sema3C\_3A-Membranen wurden von den corticalen Axonen vermieden. Auf diesen Membranstreifen waren die Axone außerdem signifikant kürzer als die Kontrolle. Der Sema3C\_3a-Streifenassay entspricht hinsichtlich der axonalen Länge dem Kontroll-Streifenassay, dennoch wuchsen die corticalen Axone vorrangig auf den Membranstreifen. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Explantate ; n.s.= signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \*\* =  $p \leq 0,001$ ; \* =  $p \leq 0,01$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.

Bei gleichem Sema3C-Gehalt aber unterschiedlichen Sema3A-Gehalt, hatten folglich die Sema3C\_3A-Membranen gegenüber den Sema3C\_3a-Membranen einen inhibitorischen Einfluss auf Anzahl und Länge corticaler Axone. Demnach müsste die Hemmung des



Wachstums der Axone durch einen höheren Anteil von Sema3A in den Sema3C\_3A-Zellen verursacht worden sein. Offensichtlich genügte ein 20%-iger Sema3A-Anteil in den Sema3C\_3a-Membranen nicht, um Axonanzahl und Axonlänge der cortikalen Fasern negativ zu beeinflussen.

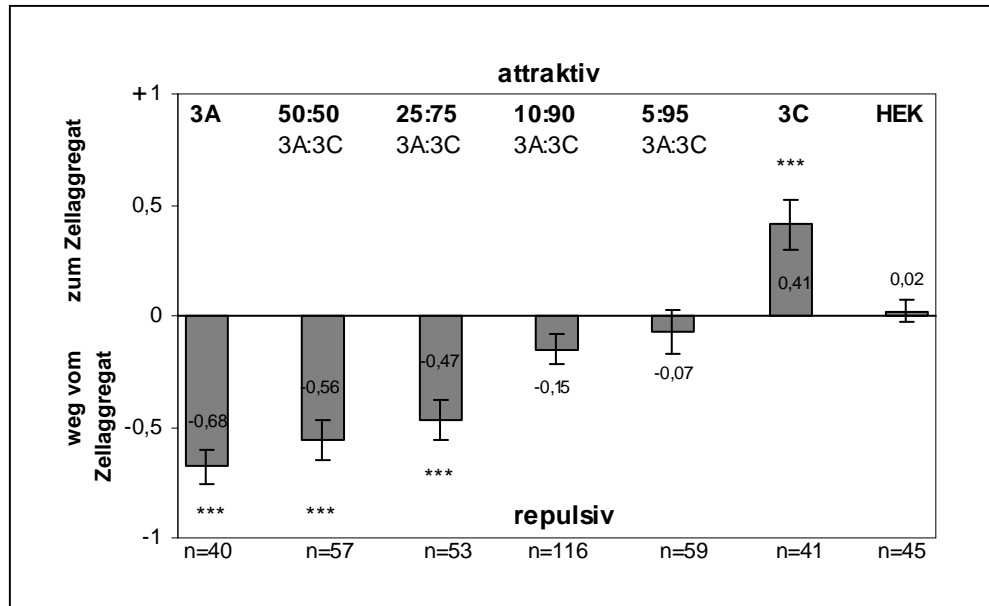
#### **4.3.2. Der Einfluss von diffusiblen Gradienten aus Semaphorin 3A und 3C auf cortikale Axone**

Die Tatsache, dass im Streifenexperiment bei gleichbleibenden Sema3C-Gehalt ein 30%-iger Sema3A-Membrananteil, aber nicht ein 20%-iger Sema3A-Membrananteil, inhibitorisch auf cortikale Axone wirkte, war überraschend. Mit Hilfe der Co-Kultur wurden die Effekte von weiteren Mischungsverhältnissen zwischen Sema3A und Sema3C getestet. Dazu wurden die AP-3A- und AP-3C-Zellen in folgenden prozentualen Verhältnissen gemischt: 50:50, 25:75, 10:90 und 5:95 (3A:3C), und dienten so der Herstellung von Zellaggregaten. Für das Wachstumsverhalten der cortikalen Axone wurden pro Explantat die Nummern 0; -1 oder +1 vergeben und verrechnet (siehe Material und Methoden). Positive Werte entsprechen demnach einem attraktiven Wachstumsverhalten, negative Werte einem repulsiven Wachstumsverhalten. Die Ergebnisse der Mischungsexperimente sind in Abb. 4.14 dargestellt.

#### **Ein diffusibler Gradient aus 50% Semaphorin 3A und 50% Semaphorin 3C induziert repulsives Wachstumsverhalten bei cortikalen Axonen**

Wie bereits in dem vorangegangenen Kapitel 4.2.2. dargestellt induzierte diffusibles Sema3A ein repulsives Wachstumsverhalten. Die cortikalen Axone wuchsen vermehrt von der Sema3A-Quelle weg. In einem Sema3C-Gradienten wuchsen die cortikalen Axone dagegen in Richtung der Semaphorin-Quelle und zeigten ein attraktives Wachstumsverhalten. Bestanden die Zellaggregate zur Hälfte aus Sema3A-sezernierenden Zellen und zur Hälfte aus Sema3C-sezernierenden Zellen (50:50), so wirkte der entstehende Semaphorin-Gradient repulsiv auf auswachsende cortikale Axone. Auch eine Reduzierung des Anteils der Sema3A-sezernierenden Zellen auf 25%, gegenüber 75% Sema3C-sezernierenden Zellen im Zellaggregat, bewirkte eine Repulsion der cortikalen Axone. Wie im Diagramm (Abb. 4.14) zu sehen sinken die berechneten Werte für die Repulsion bei Reduzierung des Sema3A-Anteils in den Zellaggregaten ausgehend vom reinen Sema3A von -0,68 auf -0,47 bei 25% Sema3A-Anteil. Offenbar reagieren bei geringeren Sema3A-Gehalt in den Zellaggregaten weniger Explantate mit repulsiven Wachstumsverhalten ihrer Axone. Bei weiterer Reduktion des Sema3A-Anteils in den Zellaggregaten auf 10% bzw. 5% war der repulsive Effekt auf die cortikalen Axone aufgehoben. Zwar war bei einem 10%-igen Anteil von Sema3A eine

Tendenz zu repulsiven Wachstumsverhalten der Axone zu beobachten, dies konnte die statistische Analyse aber nicht bestätigen, da kein signifikanter Unterschied zur Kontrollbedingung bestand.



**Abb. 4.14: Quantitative Analyse der Co-Kultur-Experimente mit verschiedenen Mischungsverhältnissen zwischen Semaphorin 3A und Semaphorin 3C.** Ein repulsives Wachstumsverhalten der cortikalen Axone war bei 3A, sowie den Mischungsverhältnissen zwischen 3A und 3C bei 50:50 und 25:75 zu beobachten. Eine Reduktion des 3A-Gehaltes auf 10% bzw. 5% führte zu weitgehend neutralen Wachstumsverhalten der Explantate. Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt: \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; n = Anzahl der analysierten Explantate.

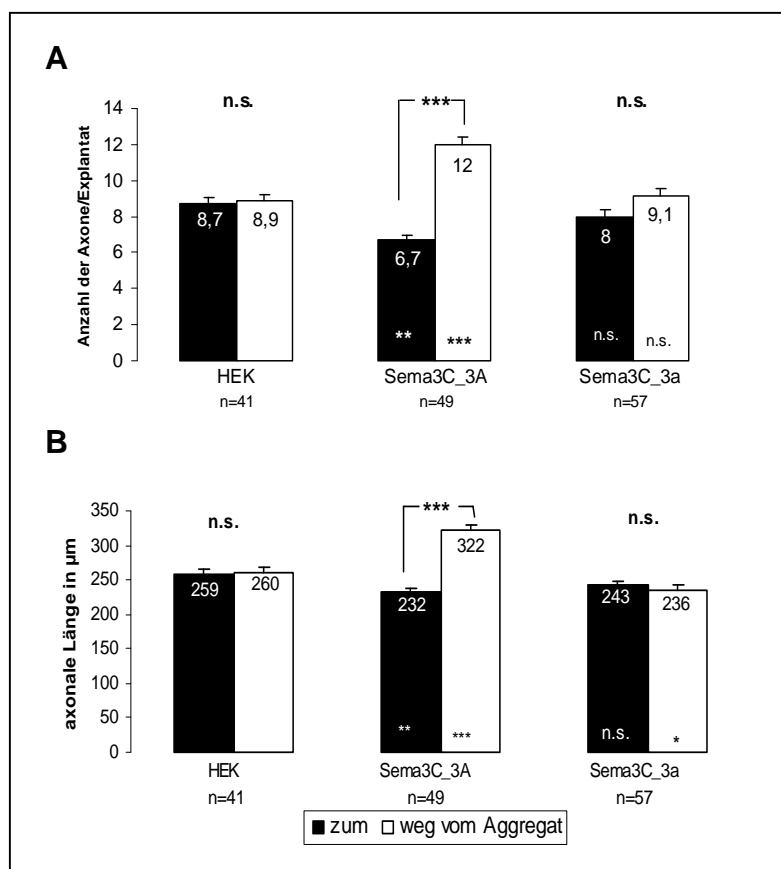
### Der Semaphorin-Gradient der Semaphorin 3C\_3A-Zellen wirkt repulsiv auf cortikale Axone

Im Weiteren wurden die Effekte der bestehenden Zelllinien Semaphorin 3C\_3A und Semaphorin 3C\_3a auf das cortikale Wachstumsverhalten in der Co-Kultur untersucht. Dabei wurden Zellen der Zelllinien Semaphorin 3C\_3A und Semaphorin 3C\_3a sowie von der Kontrollzelllinie HEK für die Herstellung der Zellaggregate verwendet. Abb. 4.15 A) und B) gibt die Quantifizierung dieser Co-Kultur-Experimente wieder.

Bei Co-Kultivierung der Semaphorin 3C\_3A-Zellen mit den cortikalen Explantaten wuchsen im Mittel 7 Axone pro Explantat in Richtung des Zellaggregates, und 12 Axone pro Explantat vom Zellaggregat weg. Die Längen der cortikalen Axone unterschieden sich mit 232  $\mu\text{m}$  in Richtung des Aggregates und 322  $\mu\text{m}$  vom Aggregat weg ebenfalls signifikant voneinander. Dadurch, dass in Richtung der Semaphorin 3C\_3A-Zellaggregate weniger und kürzere Axone wuchsen als abgewendet vom Zellaggregat, liegt die Vermutung nahe, dass der sezernierte

Semaphorin-Cocktail einen inhibitorischen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der kortikalen Fasern hatte.

Die Co-Kultivierung von Sema3C\_3a-Aggregaten mit kortikalen Explantaten zeigte, dass pro Explantat 8 Axone zum Zellaggregat und rund 9 Axone vom Zellaggregat weg wuchsen. Axone, die sich zum Sema3C\_3a-Zellaggregat orientierten, waren mit 243  $\mu\text{m}$  fast gleich so lang wie Axone, die vom Zellaggregat weg wuchsen (236  $\mu\text{m}$ ). Da sich weder die Werte der Axonlängen noch die Werte der Axonanzahl statistisch voneinander unterschieden, hatte der Semaphorin-Cocktail der Sema3C\_3a-Zellen vermutlich keine Wirkung auf das Wachstumsverhalten der kortikalen Axone.



**Abb. 4.15: Quantitative Analyse der Co-Kultur-Experimente.** Analysiert wurden die Anzahl der Axone, die zu und weg von den Zellaggregaten wuchsen (A), sowie deren Länge (B). Der Vergleich mit dem Kontrollexperiment zeigte, dass in Richtung der Sema3C\_3A-Zellaggregate weniger und kürzere Axone wuchsen. Dagegen wuchsen lange Fasern vermehrt von den Zellaggregaten weg. Die Co-Kultur mit Sema3C\_3a-Zellen war, was die Axonanzahl sowie die Axonlänge betrifft, nicht von der Kontrollsituation verschieden. Die statistische Analyse wurde mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Explantate; n.s.= signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.

## **Abnehmenden Gradienten der Sema3C\_3A-Zellen wirken wachstumsfördernd auf cortikale Axone**

Der Vergleich mit dem Kontrollexperiment soll, die durch die beiden Semaphorin-Cocktails hervorgerufene Effekte auf die cortikalen Axone deutlich machen. Die Sema3C\_3A-Zellen hatten beispielsweise der Kontrolle gegenüber im Co-Kultur-Experiment einen deutlichen Einfluss auf Anzahl und Länge ausgewachsener cortikaler Axone. In Richtung der zunehmenden Semaphorin-Gradienten aus Sema3A und Sema3C verminderte sich die Anzahl der Axone um 23% von 8,7 auf 6,7 Axone pro Explantat. Mit sinkender Axonanzahl reduzierte sich auch die axonale Länge um rund 10%, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der von den Sema3C\_3A-Zellen sezernierte Semaphorin-Cocktail einen repulsiven Einfluss auf die cortikalen Axone hatte. Demnach genügten 30% Sema3A-Anteil gegenüber 70% Sema3C, um repulsive Effekte an den cortikalen Axonen zu beobachten. Wuchsen cortikale Axone auf Sema3C\_3a-Aggregate zu, so änderte sich im Vergleich zur Kontrolle weder die Axonanzahl noch die Länge der Axone. Der von den Sema3C\_3a-Zellen sezernierte Semaphorin-Cocktail hatte also keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der cortikalen Axone.

Fasern, die dagegen in Richtung eines abnehmenden Semaphorin-Gradienten der Sema3C\_3A-Zellen wuchsen, zeigten ein völlig anderes Wachstumsverhalten. Vorangehende Co-Kultur-Experimente mit Sema3A haben bereits gezeigt, dass abnehmende Gradienten eines repulsiven Moleküls wachstumsfördernd wirken können. So wuchsen auch in diesem Fall die cortikalen Fasern vergleichsweise zum Kontrollexperiment vermehrt von den Sema3C\_3A-Aggregaten weg. Lag die Anzahl der Axone bei der Kontrolle noch bei 8,9 Axonen pro Explantat, so erhöhte sich die Axonanzahl bei den Sema3C\_3A-Zellen um über 34% auf 12,0 Axone. Mit der Axonanzahl erhöhte sich auch die Axonlänge um 24% von 260 µm auf 322 µm. Infolgedessen wäre ein sezernierter Semaphorin-Cocktail aus 30% Sema3A und 70% Sema3C in der Lage, über abnehmende Konzentrationen die Anzahl und Länge der wegwachsenden Fasern zu erhöhen. Bei gleichem Sema3C-Gehalt (70%), aber reduzierten Sema3A-Anteil (20%), erhöhte sich dagegen die Axonlänge nicht. Diese lag sogar unter dem Wert der Kontrollexperimente. Auch war die Axonanzahl im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass cortikale Axone, die in Richtung eines zunehmenden Semaphorin-Gradienten, bestehend aus 30% Sema3A und 70% Sema3C, wuchsen, repulsiv reagierten. Ein Anteil von nur 20% Sema3A im Gradienten beeinflusste die Axone dagegen nicht, und das axonale Wachstumsverhalten entsprach dem der Kontrollsituation. Axone, die in abnehmenden Semaphorin-Gradienten wuchsen, steigerten ihre Länge nur, wenn der Semaphorin-Cocktail zu 30% aus Sema3A bestand.

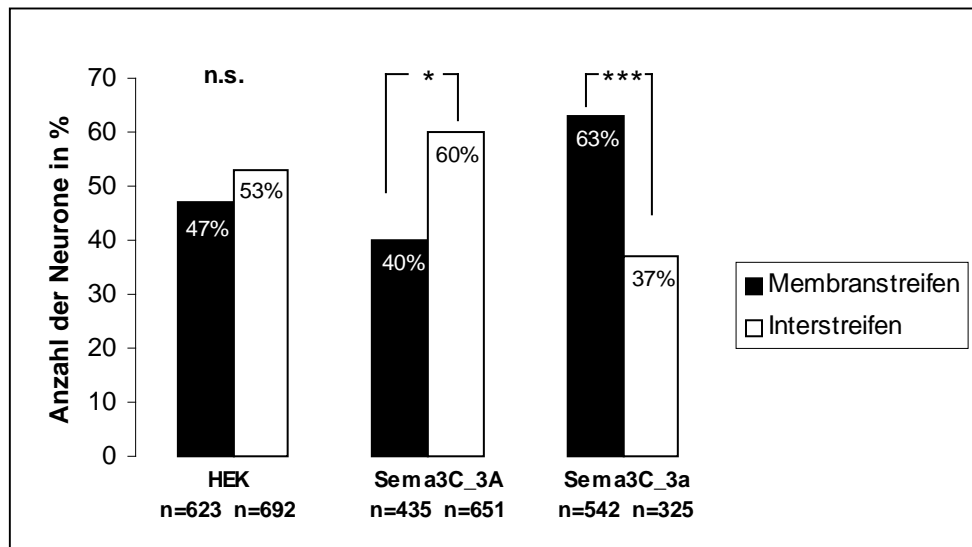
### **4.3.3. Der Einfluss von membrangebundenen Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-Gradienten auf das Wachstumsverhalten kortikaler Axone von Einzelzellen**

In den vorangegangenen Experimenten, die unter Verwendung der Sema-Zellen ausgeführt wurden, zeigte sich bereits die mögliche Beeinflussung des Wachstumsverhalten kortikaler Axone durch eine Mischung aus löslichen oder membrangebundenen Sema3A und Sema3C. Im Streifenassay wurden die Membranen der Sema3C\_3A-Zellen von kortikalen Axonen vermieden. Der durch die Zellen sezernierte Semaphorin-Cocktail aus 30% Sema3A und 70% Sema3C, wirkte sich im Co-Kultur-Experiment ebenfalls inhibitorisch auf die Axone aus. Setzte sich dagegen der Semaphorin-Cocktail aus nur 20% Sema3A und 70% Sema3C (Sema3C\_3a-Zellen) zusammen, so war keine Veränderung des Wachstumsverhaltens der kortikalen Fasern im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Der Streifenassay zeigte dagegen, dass die gleichen Semaphorine in membrangebundener Form ein bevorzugtes Wachstumssubstrat für kortikale Axone darstellen. Nun soll das Verhalten vereinzelter kortikaler Neurone (E15) auf gemischten und graduell verteilten Semaphorinmembranen getestet werden. Dazu wurden Membranen der Zelllinien Sema3C\_3A, Sema3C\_3a und HEK verwendet, und als Membrangradienten in alternierenden Streifen auf Laminin-Poly-L-Lysin-Substrat aufgebracht. Neben der Verteilung der Neurone auf den verschiedenen Streifen, wurden auch die Orientierung der ausgewachsenen Fasern im Gradienten sowie deren Länge analysiert.

#### **Neurone meiden die Membranen der Sema3C\_3A-Zellen, bevorzugen dagegen aber die Membranen der Sema3C\_3a-Zellen**

Um die Präferenz der Neurone für ein bestimmtes Substrat zu analysieren, wurden die Zellen in den Inter- und Membranstreifen ausgezählt (Abb. 4.16). Aus über 1300 analysierten Neuronen in den Kontrollexperimenten, fanden sich 47% auf den HEK-Membranstreifen und 53% in den Interstreifen mit Laminin-Poly-L-Lysin-Beschichtung. Der t-Test zeigte, dass die Axonanzahl in den Membran- und Interstreifen statistisch nicht verschieden war. Eine Präferenz für die Interstreifen war hingegen zu beobachten, wenn in den Membranstreifen Membranen der Sema3C\_3A-Zellen verwendet wurden. Dann waren 60% der analysierten Neurone in den Interstreifen und 40% der Neurone auf den Sema3C\_3A-Membranen zu finden. Da zwischen der Anzahl der Zellkörper in den Inter – und Membranstreifen ein signifikanter Unterschied bestand, müsste folglich von den Sema3C\_3A-Membranen ein inhibitorischer Einfluss ausgehen. Ganz anders war die Verteilung der Zellkörper bei Verwendung der Sema3C\_3a-Membranen. Die Neurone wuchsen bevorzugt (63%) auf den Membranstreifen. Demzufolge waren die restlichen 37% der Neurone in den Interstreifen zu

finden. Die starke Präferenz der Neurone für die Sema3C\_3a-Membranen deutet auf einen positiven Einfluss der beteiligten Semaphorine auf die kortikalen Neurone hin.



**Abb. 4.16: Quantitative Analyse der Anzahl der Zellkörper auf den Inter- und Membranstreifen der verschiedenen Membrangradienten.** Die Kontrollexperimente belegen, dass Membranen ohne Semaphorin-Anteil kein bevorzugtes Wachstumssubstrat darstellen (HEK). Dagegen vermieden die kortikalen Zellen Membranen, die aus Sema3C\_3A-Zellen hergestellt wurden. Die Neurone waren demnach bevorzugt auf den Interstreifen zu finden. Demgegenüber zeigten cortikale Neurone eine starke Präferenz für Sema3C\_3a-Membranen. Da cortikale Neurone Sema3C\_3A-Membranen meiden, aber bevorzugt auf Sema3C\_3a-Membranen wachsen, scheint von den Sema3C\_3A-Membranen ein inhibitorischer und von den Sema3C\_3a-Membranen ein förderlicher Einfluss auf die cortikalen Neurone auszugehen. Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten Neurone; n.s.= signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \* =  $p \leq 0,01$ .

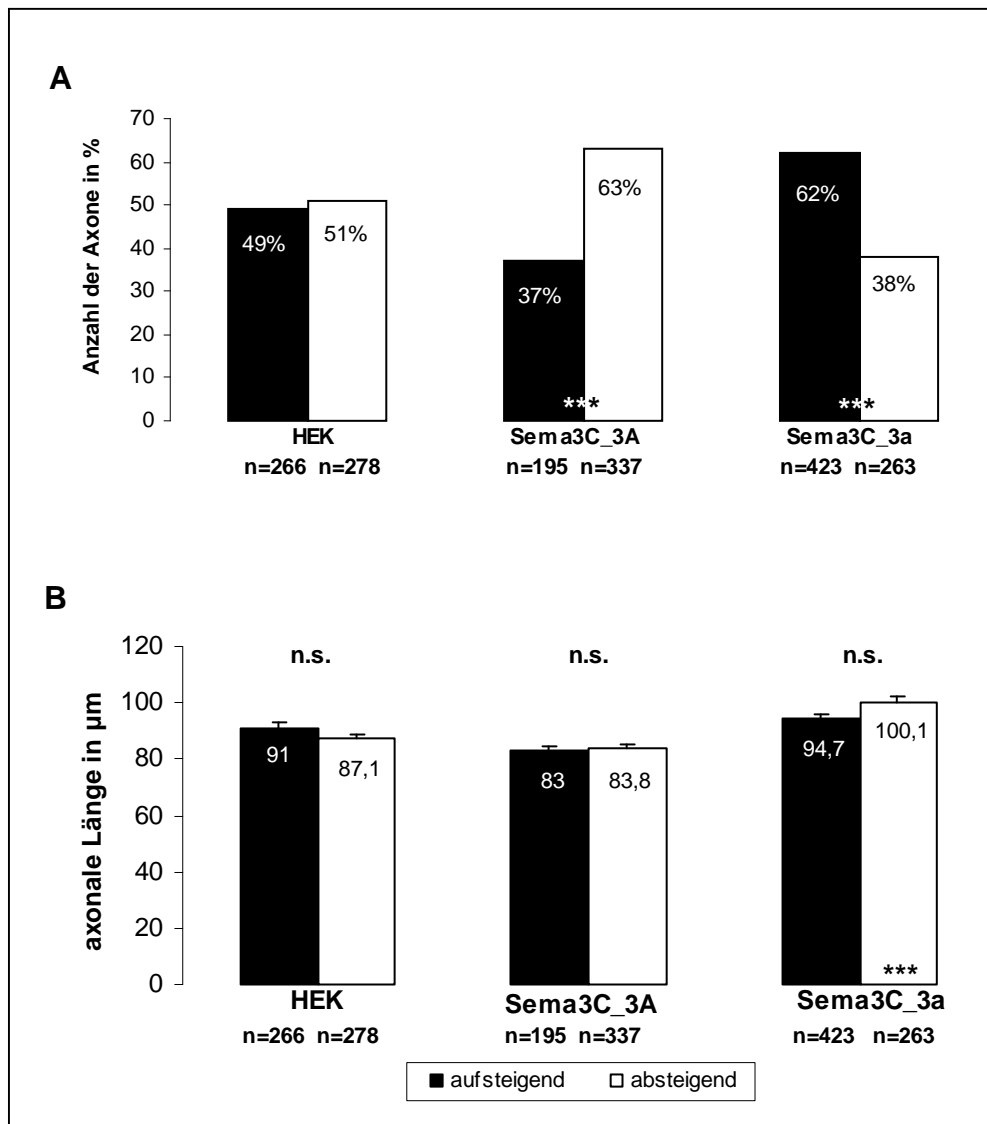
### Gemischte Semphorin 3A- und 3C-Membrangradienten haben auf die Wachstumsrichtung, nicht aber auf die Länge kortikaler Axone einen Einfluss

Die Analyse der Orientierung der Axone sowie deren Länge in den verschiedenen Semaphorin-Membranstreifen soll im folgenden Abschnitt detailliert dargestellt werden (Abb. 4.17 A) und B).

Auf graduell verteilten Kontrollmembranen wurde das Wachstumsverhalten kortikaler Axone nicht beeinflusst. Eine Kultivierung kortikaler Einzelzellen auf Sema3A- und 3C-Membrangradienten ließ allerdings ein ganz anderes Wachstumsverhalten der Axone erkennen. Bestand ein Membrangradient zu 30% aus Sema3A-Partikeln und zu 70% aus Sema3C-Partikeln, so orientierten sich 63% der kortikalen Fasern in Richtung absteigender Membrangradienten, d.h. zur niederen Membrankonzentration. 37% der Fasern wuchsen demzufolge in Richtung aufsteigender Sema3C\_3A-Gradienten, also zur höheren Membrankonzentration. Die Axonlängen unterschieden sich wie unter Kontrollbedingungen nicht statistisch voneinander. Sie betrugen 83,0  $\mu\text{m}$  in Richtung zunehmender

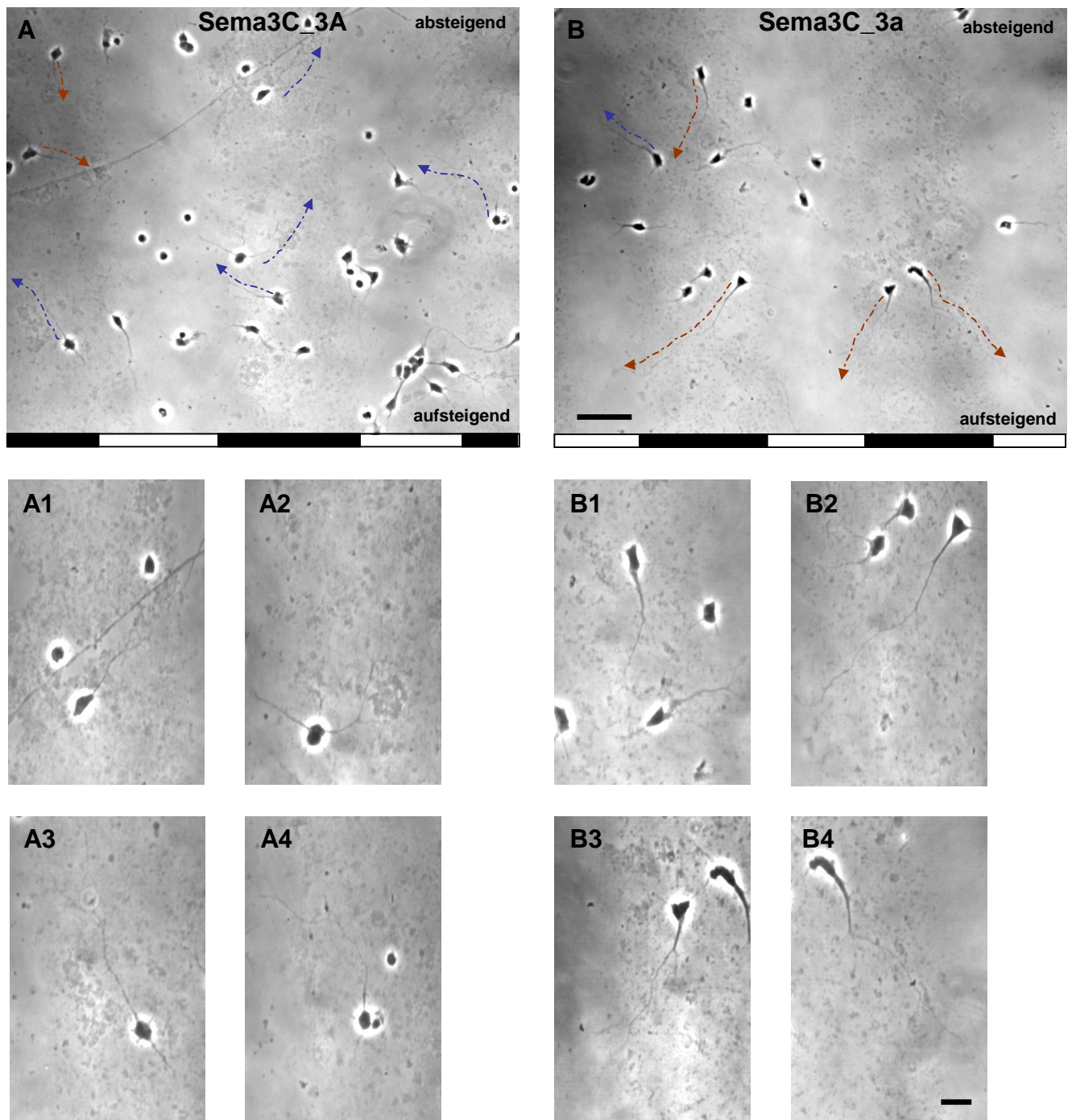
Membrankonzentrationen und 83,8  $\mu\text{m}$  in Richtung abnehmender Membrankonzentrationen. Wurden nun aber Sema3C\_3a-Membranen für die Herstellung der Gradienten verwendet, so ließ sich ein gegensätzliches Wachstumsverhalten der Axone betreffend der Orientierung im Gradienten beobachten. Die Sema3C\_3a-Membranen bestanden anteilig aus 20% Sema3A und rund 70% Sema3C, und besaßen so nur 10% weniger Sema3A als die Sema3C\_3A-Membranen. Aus über 680 analysierten kortikalen Axonen orientierten sich 62% zur zunehmenden, die restlichen 38% zur abnehmenden Sema3C\_3a-Membrankonzentration. In Richtung des aufsteigenden Sema3C\_3a-Gradienten waren die Fasern 94,7  $\mu\text{m}$  lang. Die Axone in Richtung des absteigenden Gradienten erreichten eine Länge von 100,1  $\mu\text{m}$ , und waren somit signifikant länger als Axone unter Kontrollbedingungen. Ansonsten unterschieden sich die Axonlängen in beide Richtungen des Sema3C\_3a-Membrangradienten nicht statistisch voneinander.

Aus den eben dargestellten Ergebnissen wird ersichtlich, dass die beiden Membranismischungen aus Sema3A und 3C zunächst keinen Einfluss auf die Längen der Axone abhängig von der Wachstumsrichtung im Membrangradienten hatten. Die Axonlängen waren bei HEK-, Sema3C\_3A- und Sema3C\_3a-Membrangradienten in aufsteigender und absteigender Richtung gleich groß. Lediglich verursachten die Sema3C\_3a-Membranen eine leichte Steigerung der axonalen Länge gegenüber der Kontrolle. Eine entscheidende Einflussnahme fand jedoch auf die Orientierung der Axone im Membrangradienten durch die Semaphorin-Membranen statt. Einen Überblick gibt dazu Abb. 4.18, die jeweils einen Ausschnitt der Sema3C\_3A-Gradienten (A) und Sema3C\_3a-Gradienten (B) zeigt. Bei anteilig 30% Sema3A und 70% Sema3C in den Membranen (Sema3C\_3A), orientierten sich rund zwei Drittel der Axone zur abnehmenden Membrankonzentration. Von den Membranen müsste somit ein inhibitorischer Einfluss auf die kortikalen Axone ausgehen, da sich die Mehrzahl der Axone zur niederen Konzentration orientiert. Betrug der Anteil an Sema3A, bei gleichem Sema3C-Gehalt, nur 20% (Sema3C\_3a), so wuchsen ca. zwei Drittel der Axone in Richtung zunehmender Membrankonzentration. Auf das Wachstumsverhalten kortikaler Axone hatte folglich eine Membranismischung aus 20% Sema3A und 70% Sema3C einen positiven Einfluss.



**Abb. 4.17: Quantitative Analyse der Gradienten aus Membrangradienten von Sema3A und Sema3C. A)** Analyse der Orientierungspräferenz der kortikalen Axone und **B)** der Axonlänge im Membrangradienten. In einem Sema3C-3A-Membrangradienten orientierte sich die Mehrzahl der Axone zur niederen Membrankonzentration. Im Gegensatz dazu wuchsen in Sema3C\_3a-Gradienten zwei Drittel der Axone zur höheren Membrankonzentration. Die axonale Länge variierte innerhalb der Semaphoringradienten und in den verschiedenen Richtungen des Gradienten nicht. Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten kortikalen Neurone; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation.



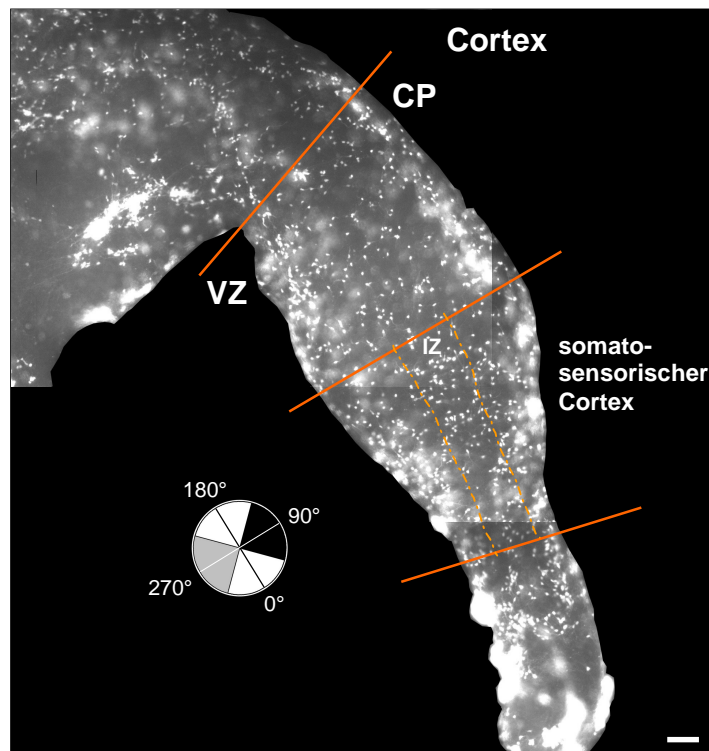


**Abb. 4.18: Phasenkontrast-Aufnahmen von Sema3C\_3A- (A) und Sema3C\_3a-Membrangradienten (B). A) und B):** Die Membrankonzentration der Gradienten nimmt von oben nach unten zu. Zudem wurde die Wachstumsrichtung der corticalen Axone auf den Membrangradienten durch einen Pfeil hervorgehoben. Unter den Photos sind die Membranstreifen (Schwarz) und Interstreifen (Weiß) zusätzlich markiert. Die corticalen Axone orientieren sich in Sema3C\_3A-Gradienten vermehrt zur absteigenden Seite des Gradienten, d.h. zur abnehmenden Membrankonzentration (A). Im Gegensatz dazu wuchsen die Axone in Sema3C\_3a-Gradienten in großer Mehrzahl zur aufsteigenden Seite des Gradienten (B). Balken: 50  $\mu$ m. In den Bildserien **A1 bis A4** sowie **B1 bis B4** sind nochmals die corticalen Axone der Sema3C\_3A- und Sema3C\_3a-Membrangradienten aus A) und B) in höherer Vergrößerung dargestellt. Balken: 10  $\mu$ m.

#### 4.4. Wachstumsverhalten von EGFP-positiven cortikalen Neuronen auf Gehirnschnitten: “Slice overlay“

Im nun folgenden Kapitel werden Ergebnisse einer weiteren *in-vitro*-Methode, dem sogenannten „slice overlay“ dargestellt. Bei diesem *in-vitro*-Assay werden Gehirnschnitte als Substrat für fluoreszenzmarkierte Explantate oder einzelne Neurone verwendet (Polleux und Ghosh, 2002). Im vorliegenden Fall wurden embryonale coronale Gehirnschnitte (E16) genutzt, um gleichaltrige cortikale Zellen, die EGFP exprimieren, aufzulagern. Der Vorteil dieser *in-vitro*-Methode ist, dass die cortikalen Zellen in einer Umgebung kultiviert werden, die der *in-vivo*-Situation ähnlich ist. In den vorangegangenen Kapiteln des Ergebnisteils wurde bereits der Einfluss der Semaphorine 3A und 3C auf das Wachstumsverhalten embryonaler cortikaler Fasern durch Darstellung verschiedener *in-vitro*-Experimente erläutert. Zudem wurde auch die kombinierte Wirkung von Sema3A und Sema3C auf cortikale Fasern *in vitro* beschrieben. Wissend, dass im E16-Cortex Sema3A (MZ, VZ und SVZ) und Sema3C (SVZ) exprimiert werden (Bagnard et al., 1998; Bürger, 2007; Skaliya et al., 1998), wurde nun das Wachstumsverhalten der aufgelagerten cortikalen Zellen in der dazwischenliegenden Intermediärzone (IZ) des somatosensorischen Cortex untersucht. Die Analyse umfasste die Orientierung der ausgewachsenen Fasern, sowie deren Länge unter Kontrollbedingungen und unter Zugabe eines funktionell blockierenden Antikörpers gegen Neuropilin 2 (anti-npn2). Zur Veranschaulichung zeigt Abb. 4.20 einen Ausschnitt aus einem coronalen Gehirnschnitt mit darauf kultivierten EGFP-positiven Zellen. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die cortikalen Zellen gleichmäßig auf dem gesamten Schnitt verteilt sind. Der somatosensorische Cortex, sowie die in die Analyse einbezogene IZ sind zusätzlich markiert. Fasern in der IZ, die sich zur cortikalen Platte (CP; 45° -135°) oder zur VZ (225° - 315°) orientierten, wurden vermessen (siehe auch Material und Methoden).

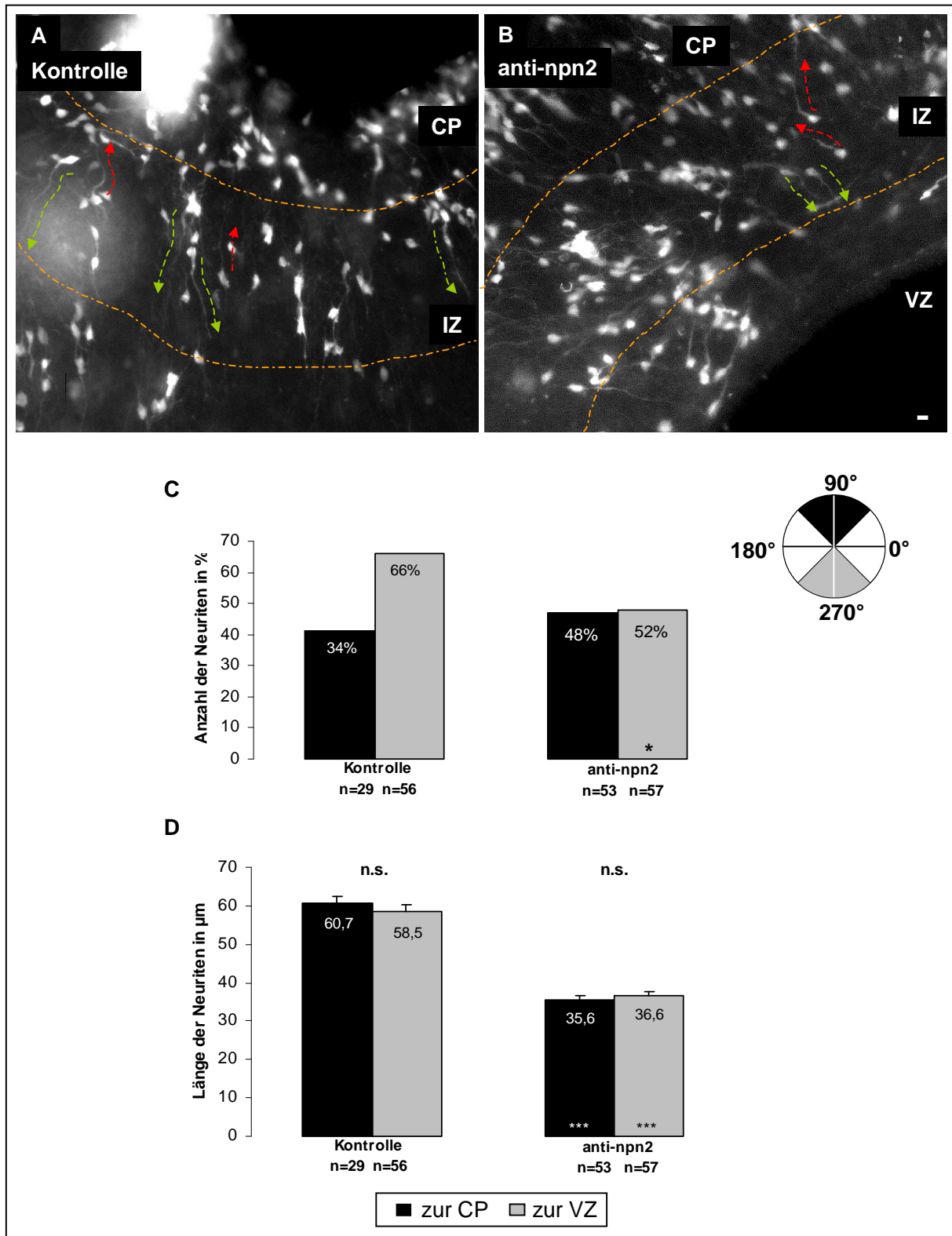
Die quantitative Analyse der „slice overlay“-Experimente ist in Abb. 4.21 dargestellt, wobei A) und B) zunächst fotografische Aufnahmen der Schnitte unter Kontrollbedingungen (A) und unter Zugabe des Antikörpers (B) zeigen. Auffällig ist, dass bei der Kontrolle die Fasern vermehrt in Richtung der VZ wuchsen, wobei sich bei Zugabe von anti-npn2 die Fasern gleichermaßen in beide Richtungen, zur VZ und zur CP, orientierten.



**Abb. 4.20: Fotografische Aufnahme von einem kortikalen Gehirnschnitt.** Der Cortex des Gehirnschnittes wurde gedreht; das mittlere Drittel entsprach dem somatosensorischen Cortex. Cortikale Zellen in der IZ des somatosensorischen Cortex wurden hinsichtlich ihrer Orientierung zu CP oder VZ und ihrer Faserlänge analysiert. Balken: 100  $\mu$ m. IZ = Intermediärzone, CP = cortikale Platte, VZ = Ventrikularzone.

Unter Kontrollbedingungen wuchsen demnach 34% der Fasern in der IZ des Cortex in Richtung der CP. 66% der corticalen Axone richteten sich zur VZ aus. Bei Zugabe eines Antikörpers gegen Neuropilin 2, war dann eine bevorzugte Wachstumsrichtung der corticalen Fasern nicht mehr gegeben. 52% der analysierten Neuriten wuchsen in Richtung der CP; 48% orientierten sich zur VZ des Cortex. Die Länge der Fasern betreffend, gab es keinen Unterschied, wenn die Fasern in Richtung der CP oder der VZ wuchsen. Das galt sowohl für Kontrollbedingungen als auch unter anti-npn2-Einfluss. Allerdings waren die Fasern unabhängig von ihrer Wachstumsrichtung nach anti-npn2-Zugabe signifikant kürzer als unter Kontrollbedingungen. Bei der Kontrolle lag die Faserlänge im Mittel bei 60  $\mu$ m, unter Zugabe des Antikörpers dann bei 36  $\mu$ m. Folglich müssen die längeren Fasern in der Kontrollsituation einem wachstumsfördernden Einfluss unterliegen, der dann nach anti-npn2-Zugabe blockiert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die bevorzugte Wachstumsrichtung zur VZ unter Kontrollbedingungen durch Blockierung von Neuropilin 2, der Bindestelle für Sema3C am Rezeptor, aufgehoben wurde. Zudem wurde durch Zugabe des funktionell blockierenden Antikörpers gegen Neuropilin 2 die Faserlänge signifikant reduziert. Inwieweit die im Cortex exprimierten Semaphorine 3A und 3C bei diesen Effekten involviert sind, soll in der Diskussion eingehend erörtert werden.



**Abb. 4.21: Analyse der „slice overlay“-Experimente.** A) und B) zeigen fotografische Aufnahmen von Gehirnschnitten mit aufgelagerten Cortezzellen unter Kontrollbedingungen (A) und unter Zugabe von anti-npn2 (B). Balken: 5  $\mu\text{m}$ . C) und D) stellen die quantitative Analyse dar. Cortikale Neuriten wachsen bei der Kontrolle bevorzugt zur VZ, und sind im Mittel 60  $\mu\text{m}$  lang. Unter npn2-Einfluss erreichen die Neuriten eine Länge von rund 36  $\mu\text{m}$  und wachsen sowohl zur VZ als auch zur CP. Die statistische Analyse der Neuritenanzahl wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests, und die der Länge mit dem t-Test durchgeführt. n = Anzahl der analysierten corticalen Neurone; n.s. = nicht signifikant; \*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ; \* =  $p \leq 0,05$ . Die Signifikanzangabe in den Balken bezieht sich auf die jeweilige Kontrollsituation. IZ = Intermediärzone, CP = cortikale Platte, VZ = Ventrikularzone.

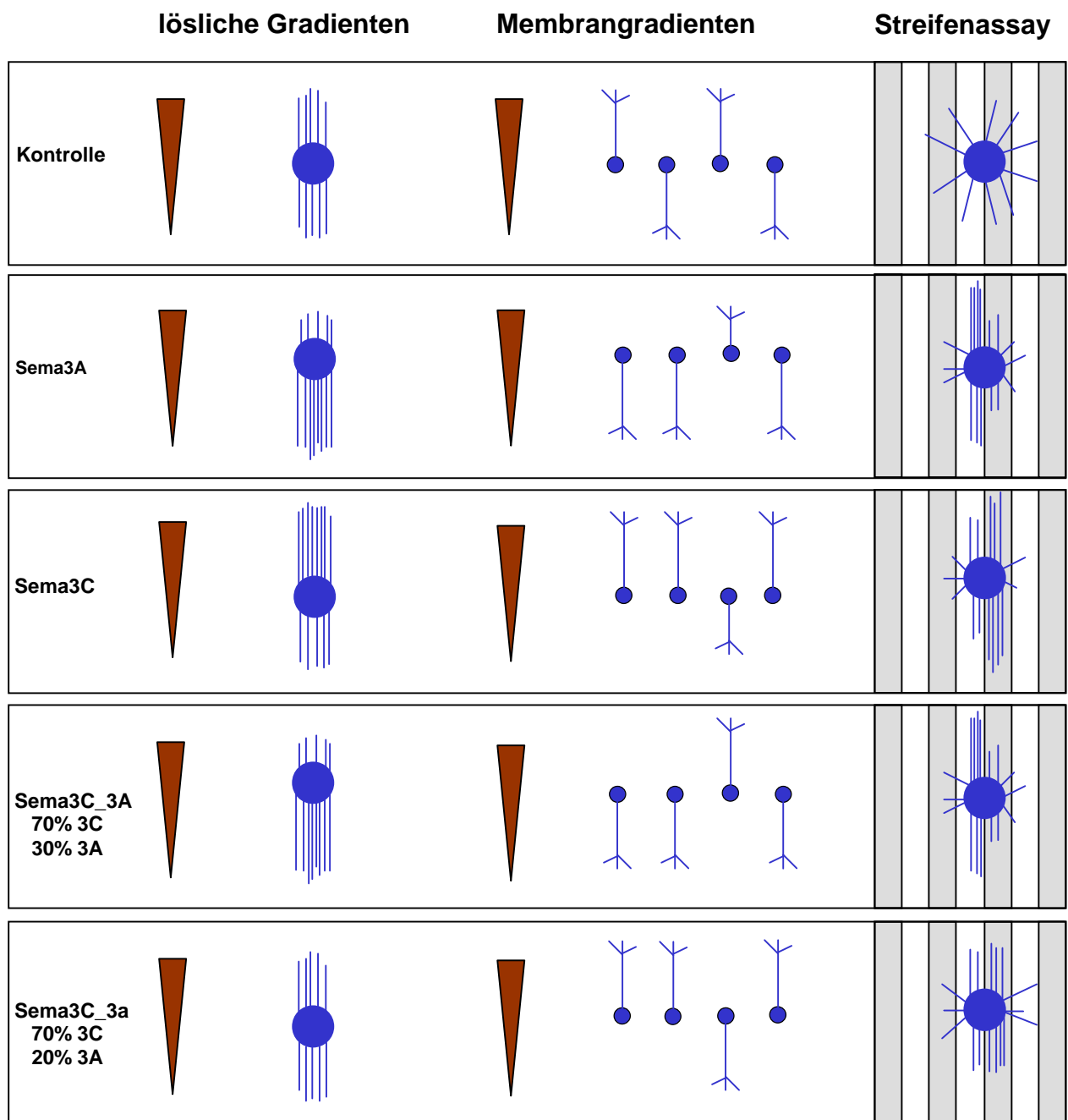
## 5. Diskussion

---

Während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems werden der Proteinfamilie der Semaphorine vielfältige Funktionen zugeschrieben. Durch eine Vielzahl von *in-vitro*-Studien wurde unter anderem die Beteiligung der Semaphorine an der neuronalen Migration sowie der dendritischen und axonalen Wegfindung belegt (Chen et al., 2008; Fenstermaker et al., 2004; He et al., 2002; Koncina et al., 2007; Polleux et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Bedeutung der Klasse-3-Semaphorine Sema3A und Sema3C auf die Wegfindung kortikaler Axone mit Hilfe verschiedener *in-vitro*-Experimente näher untersucht. Für die Durchführung der Experimente wurde kortikales Gewebe des Embryonalstadiums 15 bzw. 16 gewählt, da in diesen Zeitraum die Expressionsmuster für Sema3A und Sema3C im Cortex sehr komplex sind. Darüber hinaus wurde bereits ein Effekt beider Semaphorine auf kortikale Axone dieses Alterstadiums gezeigt (Bagnard et al., 1998; Bagnard et al., 2000). Sema3A und Sema3C gehören zu den Klasse-3-Semaphorinen und somit zu den Proteinen, die von Zellen sezerniert werden (Püschel, 1999). Zudem werden diese diffusiblen Semaphorine aber auch durch ionische Interaktionen an Membranen oder an die ECM gebunden (Fu et al., 2000; Luo et al., 1993; Raper und Kapfhammer, 1990). Entsprechend dieses Vorkommens von Sema3A und Sema3C, in löslicher und membrangebundener Form, wurden die *in-vitro*-Experimente ausgewählt. Zur Untersuchung des Einflusses diffusibler Lenkungsmoleküle eigneten sich dreidimensionale Co-Kulturen. In diesem Fall wurden Semaphorin-sezernierende Zelllinien und kortikale Explantate in einem Plasmaclot co-kultiviert. Die Bindung von Sema3A und Sema3C an Membranen ermöglicht zudem die Herstellung von semaphorinhaltigen Membransubstraten aus den verschiedenen Semaphorin-Zelllinien für den Streifenassay und die Membrangradienten. Die Co-Kultur scheint aber im Vergleich zu anderen *in-vitro*-Experimenten eher physiologischen Bedingungen zu entsprechen (Harris et al., 1985). Abb. 5.1 gibt einen Überblick über die verschiedenen methodischen Ansätze und die Ergebnisse, die in der vorliegenden Doktorarbeit erzielt wurden.





**Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Co-Kultur, der Membrangradienten sowie des Streifenassays.** Die verschiedenen Experimente wurden unter Verwendung der verschiedenen Zelllinien (Co-Kultur) sowie deren semaphorinhaltigen Membranen (Membrangradienten und Streifenassay) durchgeführt.

## 5.1. Sema3A ist ein repulsives Signal für cortikale Axone

1993 wurde Sema3A als sogenanntes Kollapsin-1 aus dem Gehirn des Hühnchens isoliert. Rekombinantes Kollapsin-1 verursachte bereits im picomolaren Konzentrationsbereich reversibel den Kollaps der axonalen Wachstumskegel von Spinalganglien und galt folglich als repulsives Molekül (Luo et al., 1993; Raper und Kapfhammer, 1990). In den folgenden Jahren wurde die Funktion dieses repulsiven Moleküls in verschiedenen Systemen intensiv untersucht. Neben der Repulsion von sensorischen Axonen wirkt Sema3A z.B. auch repulsiv auf motorische, olfaktorische und hippocampale Axone (Chedotal et al., 1998; Kobayashi et al., 1997; Messersmith et al., 1995; Varela-Echavarria et al., 1997).

Wurden cortikale Explantate mit Aggregaten von Sema3A-sezernierenden Zellen co-kultiviert, so wuchsen im Vergleich zur Kontrollbedingung 20% weniger Axone in Richtung der Sema3A-Quelle. Zudem waren diese Axone unter dem Einfluss des diffusiblen Sema3A um 20% kürzer. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Hilfe des Streifenassays erzielt. Cortikale Axone mieden Streifen, die Sema3A-Membranen enthielten. Folglich wuchsen 45% weniger Axone auf den Sema3A-Membranstreifen als bei der Kontrolle. Wie bei der Co-Kultur war die Länge der Axone unter Sema3A-Wirkung reduziert, in diesem Fall um 37%. Die *in-vitro*-Experimente belegten übereinstimmend eine repulsive Beeinflussung des Wachstumsverhaltens cortikaler Axone durch Sema3A, da sowohl in Anwesenheit von diffusiblen Sema3A als auch von membrangebundenen Sema3A weniger und kürzere cortikale Axone von den Explantaten auswuchsen als in der Kontrollsituation. Die repulsive Wirkung von diffusiblen und membrangebundenen Sema3A auf cortikale Axone wurde bereits in zwei *in-vitro*-Studien gezeigt (Bagnard et al., 1998; Castellani et al., 2000). Bagnard et al. (1998) beschrieben außerdem, dass Sema3A signifikant die Anzahl der kollabierten Wachstumskegel erhöhte. Da cortikale Axone, die in der Co-Kultur auf eine Sema3A-Quelle zuwuchsen kürzer waren als bei der Kontrolle, liegt die Vermutung nahe, dass die kürzeren Axone unter Sema3A-Einwirkung durch vermehrte Wachstumskegelkollapse zustande kamen. Ähnlich verhielt es sich auch mit den corticalen Axonen auf Sema3A-haltigen Membranen, wo die reduzierte Länge der Axone wohl auch auf Sema3A-induzierte Wachstumskegelkollapse zurückzuführen sein könnte, da sich die Wachstumsgeschwindigkeiten der Axone auf Sema3A-Membranen und Kontrollmembranen nicht voneinander unterschieden (Bagnard et al., 1998; Bagnard et al., 2000). Insbesondere die Ergebnisse des Streifenassays haben gezeigt, dass ein Substrat, was das Wachstum corticaler Axone begünstigt, durch die alleinige Anwesenheit von Sema3A in ein Substrat umgewandelt werden kann, dass das Wachstum der Axone inhibiert. Verschiedene Studien bestätigten bereits die repulsiven Eigenschaften von Sema3A *in vivo*, indem Sema3A das Wachstum von Axonen in Nicht-Projektionsgebiete unterbindet (Messersmith et al., 1995;

Püschel et al., 1995; Renzi et al., 2000). Beispielsweise ist Sema3A während der Periode des Einwachsens von sensorischen Axonen im ventralen Rückenmark exprimiert, bei der Maus wäre dies am Embryonaltag 12,5. Im ventralen Rückenmark terminieren Neurotrophin-3 (NT-3)-sensitive Axone, im dorsalen Rückenmark dagegen nur Axone, die auf NGF (Nerve Growth Factor) sensitiv sind. In einem Co-Kultur-Experiment aus Spinalganglien und Explantaten von ventralem Rückenmark konnte gezeigt werden, dass die NGF-sensitiven Axone vom ventralen Rückenmark abgestoßen werden, nicht aber die NT-3-sensitiven Axone. Somit bewirkte, das im ventralen Rückenmark exprimierte Sema3A eine Repulsion von sensorischen Axonen, die normal dorsal terminieren (Messersmith et al., 1995).

Um ihre Wirkung zu entfalten benötigen Klasse-3-Semaphorine einen Plexin-Neuropilin-Rezeptorkomplex, wobei die Neuropiline für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Dass Neuropilin 1 Bestandteil des Rezeptorkomplexes für Sema3A ist, bestätigen verschiedene *in-vitro*-Experimente (He und Tessier-Lavigne, 1997; Kolodkin et al., 1997; Nakamura et al., 1998; Song et al., 1998). He et al. (1997) wiesen z.B. nach, dass durch die Zugabe eines Antikörpers gegen Neuropilin 1 der durch Sema3A induzierte Wachstumskegellkollaps sensorischer Axone blockiert wurde. Darüber hinaus waren sensorische Axone einer Neuropilin 1 <sup>-/-</sup> Maus unempfindlich gegenüber dem Sema3A-induzierten Wachstumskegellkollaps (Kitsukawa et al., 1997). Die Arbeitsgruppe um Tessier-Lavigne belegte erstmals, dass die Ligandenbindedomäne des Sema3A-Rezeptors ein Neuropilin 1-Homodimer darstellt (Chen et al., 1998).

## 5.2. Sema3C ist ein attraktives Signal für cortikale Axone

Neben Sema3A wirken noch weitere Klasse-3-Semaphorine repulsiv auf auswachsende Axone. So werden z.B. Axone von Ganglien des Sympathikus des Hühnchens von Sema3A als auch von Sema3B und Sema3C im Co-Kultur-Experiment abgestoßen (Adams et al., 1997). Aufgrund der repulsiven Eigenschaft von Sema3C wurde das Lenkungsmolekül ursprünglich auch Kollapsin-3 genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Einfluss von Sema3C auf cortikale Axone untersucht.

Die Co-Kultivierung von corticalen Explantaten und Sema3C-sezernierenden Zellen bestätigte, dass diffusibles Sema3C einen maßgeblichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Axone hatte. In Richtung der Sema3C-Quelle wuchsen 30% mehr Axone, die wiederum signifikant länger waren als unter Kontrollbedingungen. Auf membrangebundenen Sema3C im Streifenassay verdoppelte sich gegenüber der Kontrollsituation die Anzahl der Axone. Sie zeigten also eine klare Präferenz für Membranen, die Sema3C enthielten. Vergleichbar zur Co-Kultur erhöhte sich unter Sema3C-Einfluss auch die axonale Länge, sie steigerte sich im Vergleich zur Kontrolle um 54%. Zusammenfassend



lässt sich sagen, dass Sema3C in diffusibler als auch in membrangebundener Form auswachsende cortikale Axone attraktiv beeinflusst. Die Attraktion durch Sema3C auf cortikale Axone äußerte sich einerseits in einer Steigerung der Axonanzahl, andererseits in einer Erhöhung der Axonlänge. Der attraktive Effekt von Sema3C auf cortikale Axone, den bereits Bagnard et al. (1998) beschrieben, konnte somit mit den vorliegenden Ergebnissen der *in-vitro*-Experimente bestätigt werden. Neben der Sema3C-vermittelten Attraktion auf cortikale Axone, sind in der Literatur lediglich zwei weitere Angaben zu finden, wo eine durch Klasse-3-Semaphorine induzierte Attraktion beschrieben wird. So wirkt z.B. Sema3B attraktiv auf olfaktorische Axone und Sema3F attraktiv auf Axone der Körnerzellen des Cerebellums (de Castro et al., 1999; Ding et al., 2007).

Die Klasse-3-Semaphorine sind im sich entwickelnden Nervensystem weit exprimiert und spielen eine tragende Rolle bei der axonalen Lenkung (Fiore und Puschel, 2003; Skaliya et al., 1998). Die meisten bekannten Wirkungen von diesen Semaphorinen, z.B. von Sema3A sind repulsiv. Die Identifikation von Sema3C als attraktives Signal für cortikale Axone bestätigt zum einen die Bifunktionalität der Semaphorine, zum anderen hilft es möglicherweise die Entwicklung neuronaler Schaltkreise besser zu verstehen.

### **5.2.1. Der attraktive Effekt von Sema3C wird durch Neuropilin 2 vermittelt**

Neuropilin 2 ist neben Neuropilin 1 eine essentielle Komponente des Sema3C-Rezeptorkomplexes (Chen et al., 1997; He et al., 2002). Zu der Co-Kultur von corticalen Explantaten und Semaphorin-sezernierenden Zellen wurde ein funktionell blockierender Antikörper gegen Neuropilin 2 zugegeben und so die Auswirkungen auf den durch Sema3C-induzierten attraktiven Effekt auf cortikale Axone näher untersucht.

Bei den Co-Kultur-Experimenten mit Sema3A-sezernierenden Zellen und corticalen Explantaten war stets ein repulsives Wachstumsverhalten der corticalen Axone zu beobachten, auch unter Zugabe des Antikörpers gegen Neuropilin 2. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Studien über den repulsiven Effekt von Sema3A bestätigt, die Neuropilin 1 als Sema3A-Bindestelle einstufen (Chen et al., 1998; Takahashi et al., 1998). Wurden dagegen Sema3C-sezernierende Zellen und cortikale Explantate unter Zugabe von anti-Neuropilin 2 kultiviert, so wurde das attraktive Wachstumsverhalten der corticalen Axone aufgehoben und in ein repulsives Verhalten konvertiert. D.h., dass bei Blockierung der Sema3C-Bindestelle von Neuropilin 2, die corticalen Axone vermehrt von den Sema3C-Zellaggregaten wegwuchsen. Das Phänomen der Konversion einer attraktiven Reaktion auf ein Lenkungsmolekül in eine repulsive Reaktion wurde schon für Netrin-1, BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) und den Neurotransmitter Acetylcholin

beschrieben (Höpker et al., 1999; Song et al., 1998; Song et al., 1997). Höpker et al. (1999) zeigten z.B. mit dem sogenannten „turning assay“, dass Axone retinaler Explantate von *Xenopus* attraktiv auf Netrin-1 reagierten und in Richtung der Netrin-1-Quelle wuchsen. Die attraktive Antwort der Axone auf Netrin-1 wurde dann aber in Gegenwart von löslichen bzw. membrangebundenen Laminin oder bei geringer cAMP-Konzentration (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) in eine repulsive Reaktion konvertiert. Folglich kann durch Veränderung der intrazellulären Konzentration der zyklischen Nukleotide eine Attraktion (hoher cAMP- bzw. cGMP-Gehalt) in eine Repulsion (niedriger cAMP- bzw. cGMP-Gehalt) und umgekehrt umgewandelt werden (Song und Poo, 1999). Dies wurde auch am Beispiel von Sema3A gezeigt, wo bei hohem cGMP-Gehalt (zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat) die Sema3A-induzierte Repulsion in eine Attraktion umgeschaltet wurde (Song et al., 1998). Verschiedene Studien belegen, dass u.a. elektrische Aktivität sowie die Aktivierung endogener Guanylat- und Adenylatzyklasten durch NO den Gehalt an intrazellulären zyklischen Nukleotiden ändern können (Ming et al., 2001; Southam und Garthwaite, 1991). Somit können auch intrazelluläre Zustandsänderungen der Neurone die Reaktion der Wachstumskegel auf Lenkungsmoleküle beeinflussen. Die eben aufgezählten Beispiele schildern eine Konversion der Attraktion in eine Repulsion in Abhängigkeit von intrazellulären Zuständen wie dem cAMP- oder cGMP-Gehalt. Die vorliegende Arbeit konnte dagegen einen neuen Mechanismus der Konversion einer attraktiven Reaktion in eine repulsive Reaktion aufzeigen. Die Konversion der durch Sema3C induzierten Attraktion in eine Repulsion wurde durch Blockierung von Neuropilin 2 erlangt. Folglich scheint für eine Sema3C-induzierten Attraktion Neuropilin 2 als Komponente des Sema3C-Rezeptorkomplexes unabdingbar zu sein.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen der Co-Kultur legen die Vermutung nahe, dass die Effekte von Sema3A bzw. Sema3C durch die spezifische Beteiligung der Neuropiline am Semaphorin-Rezeptor zustande kommen. Wie schon erwähnt wird die Sema3A-induzierte Repulsion durch Neuropilin 1-Homodimere als Ligandenbindedomäne am Semaphorin-Rezeptor realisiert. Die Sema3C-induzierte Attraktion wird dagegen durch Neuropilin 2-Homodimere oder einem Heterodimer aus Neuropilin 1 und Neuropilin 2 vermittelt (Chen et al., 1998; Takahashi et al., 1998). In dem vorliegenden Fall konnte die Blockierung der Neuropilin 2-Bindestelle, wie in der Co-Kultur durch Zugabe des funktionell blockierenden Antikörpers gegen Neuropilin 2 geschehen, die Konversion der durch Sema3C induzierten Attraktion in eine Repulsion der kortikalen Axone hervorrufen. Da nur noch Neuropilin 1 als Semaphorin-Bindestelle zur Verfügung stand, bewirkte die Sema3C-Bindung an Neuropilin 1-Homodimere dann ein repulsives Wachstumsverhalten der kortikalen Axone. Dementsprechend könnte Sema3C je nach Expression der Neuropiline attraktiv oder repulsiv auf auswachsende kortikale Axone wirken. Im Falle von Sema3D wurde dessen

Bifunktionalität unter Beteiligung der Neuropiline auf die Wegfindung von Axonen im Zebrafisch bereits nachgewiesen (Wolman et al., 2004). Sema3D wirkt zum einen attraktiv auf Axone aus dem Telencephalon, welche die anteriore Kommissur bilden. Diese Attraktion wird durch Heterodimere, die sich aus Neuropilin 1A und Neuropilin 2B zusammensetzen, vermittelt. Zum anderen bewirkt Sema3D eine Repulsion von Axonen, die dem Nucleus longitudinalis medialis entspringen und den Hirnstamm longitudinal durchziehen. Die Repulsion dieser Axone wird durch Neuropilin 1A-Homodimere vermittelt. Die Studie am Zebrafisch bestätigte damit, dass das gleiche Semaphorin je nach Konstellation der Neuropiline im Semaphorin-Rezeptor attraktiv oder repulsiv wirken kann. Die bifunktionale Wirkungsweise in Abhängigkeit von der Rezeptorzusammenstellung wurde auch für Sema3E gezeigt (Chauvet et al., 2007). Bindung von Sema3E an Plexin D1 induziert bei kortikalen und striatalen Axonen repulsive Reaktionen. Unter Beteiligung von Neuropilin 1 reagieren dagegen subikuläre Axone attraktiv. Als weiteres Beispiel für ein bifunktionelles Lenkungsmolekül kann Netrin-1 angeführt werden. Je nach Expression der Netrin-Rezeptoren auf den beteiligten Zellen oder Axonen wirkt Netrin-1 chemoattraktiv oder chemorepulsiv. Eine attraktive Reaktion wird durch Bindung von Netrin-1 an DCC (deleted in colorectal cancer) hervorgerufen. Eine repulsive Reaktion benötigt dagegen eine Co-Expression von einem UNC-Protein und DCC (Moore et al., 2007).

Die große Variation der biologischen Funktionen kommt darüberhinaus durch Bindung der Semaphorine an verschiedene Neuropilin/Plexin-Komplexe zustande. So bindet Sema3A an einem Rezeptorkomplex bestehend aus Neuropilin 1 und einem A-Plexin und bewirkt so eine repulsive Reaktion (Nakamura et al., 2000; Negishi et al., 2005). Sema3C interagiert dagegen mit einem Neuropilin/Plexin D1-Komplex, wobei Neuropilin 1 und Neuropilin 2 mögliche Bindungsstellen sind (Gitler et al., 2004). Diese unterschiedlichen Rezeptor-Heterodimere können schließlich in differentiellen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden resultieren, und damit für die repulsiven bzw. attraktiven Effekte der Semaphorine verantwortlich sein. An den intrazellulären Signalwegen der Semaphorine ist eine Vielzahl an verschiedenen Proteinen beteiligt, die insbesondere eine Reorganisation des Zytoskeletts bewirken (He et al., 2002; Negishi et al., 2005). Wie die intrazellulären Kaskaden nach Sema3A- bzw. nach Sema3C-Bindung genau ablaufen oder differieren, müssen zukünftige Studien zeigen. Bisher ist zwar der Sema3A-induzierte Wachstumskegellkollaps in Ansätzen verstanden, die intrazellulären Kaskaden nach Sema3C-Bindung aber noch nicht. Dagegen ist man im Falle der Wirkung von EphrinA5 auf kortikale Neurone, der Aufklärung der damit verbundenen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden schon einen Schritt näher. Die Arbeitsgruppe Bolz konnte beispielsweise unter Verwendung des Streifenassays zeigen, dass der repulsive Effekt von EphrinA5 auf kortikale Neurone nach Blockierung der Src-Familie-Kinasen in einen

attraktiven Effekt konvertiert wurde (Zimmer et al., 2007). Die Aufklärung der intrazellulären Signalwege der verschiedenen axonalen Lenkungsmoleküle bedarf daher weiterer intensivster Forschung.

### **5.3. Verhalten von cortikalen Axonen in diffusiblen und membrangebundenen Sema3A- und Sema3C-Gradienten**

Die Vorstellung, dass räumliche Gradienten von Substanzen das Axonwachstum beeinflussen ist alt (Cajal, 1892; Sperry, 1963). Es existieren zwei verschiedene Wege, um Gradienten zu schaffen. Erstens, durch Diffusion löslicher Lenkungsmoleküle können lösliche Gradienten entstehen, wobei höhere Konzentrationen der Moleküle in der Nähe der Quelle vorliegen, in weiterer Entfernung nimmt die Konzentration der Moleküle dann ab. Zweitens, durch graduelle Expression von Lenkungsmolekülen auf einem Substrat bilden sich membrangebundene Gradienten. Die lokale Konzentration der Lenkungsmoleküle im Substrat wird z.B. durch die lokale Konzentration der jeweiligen Transkriptionsfaktoren festgelegt. Der Wachstumskegel nimmt durch Bindung der diffusiblen oder membrangebundenen Lenkungsmoleküle an seine Rezeptoren Konzentrationsunterschiede in seiner räumlichen Ausdehnung wahr. Dieses Signal wird dann in eine richtungsweisende Bewegung des Wachstumskegels umgesetzt. So entspricht z.B. das Wachstum des Wachstumskegels in Richtung hoher Konzentration eines Lenkungsmoleküls einer attraktiven Reaktion, das Wachstum in Richtung niedriger Konzentrationen dagegen einer repulsiven Reaktion. Nach einem mathematischen Modell liegen die maximalen Bereiche für eine axonale Lenkung bei diffusiblen Gradienten bei 1 mm und bei membrangebundenen Gradienten bei 1 cm (Goodhill, 1998). Verschiedene Studien zeigten den Einfluss von diffusiblen Gradienten verschiedener Lenkungsmoleküle auf die axonale Lenkung. So wurden z.B. attraktive Effekte auf verschiedenartige Axone durch Gradienten aus NGF, Sema3C und Acetylcholin nachgewiesen (Bagnard et al., 1998; Gundersen und Barrett, 1979; Lumsden und Davies, 1983; Zheng et al., 1994). Demgegenüber induzierten lösliche Gradienten von Sema3A, Slit und Netrin eine Repulsion auswachsender Axone (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995; Li et al., 1999; Pini, 1993; Song et al., 1998). Dass Lenkungsmoleküle nicht nur eine Attraktion oder Repulsion von Axonen hervorrufen können, zeigte die Arbeitsgruppe Bolz. Diffusible Gradienten von Acetylcholin induzierten bei embryonalen thalamischen Axonen ein sogenanntes „pausing“-Verhalten: nach Applikation von Acetylcholin stoppten die thalamischen Axone ihr Wachstum. Dagegen war der Wachstumskegel hoch motil, Filopodien wurden neu gebildet und wieder zurückgezogen. Dieses „pausing“-Verhalten scheint während der axonalen Zielfindung besonders in

Entscheidungsregionen, wo eine Richtungsänderung der wachsenden Axone erforderlich ist, zur Neuorientierung von großer Bedeutung zu sein (Ruediger und Bolz, 2008).

Das am besten charakterisierte Beispiel für einen membrangebundenen Gradienten stellt die retinotectale Projektion der Wirbeltiere dar. Dabei werden die Ephrine und ihre Rezeptoren in verschiedenen Gradienten exprimiert. Die EphA3-Rezeptoren sind in der Retina in einem Gradienten lokalisiert, der von nasal in temporale Richtung ansteigt. Die EphrinA2-Liganden werden dagegen im Tectum graduell exprimiert, wobei eine Zunahme der Konzentration von anterior nach posterior zu beobachten ist. Temporale retinale Axone, die auf ihrer Oberfläche die EphA3-Rezeptoren stark exprimieren, projizieren in das anteriore Tectum mit geringer EphrinA2-Expression. Vom posterioren Tectum werden die temporalen retinalen Axone abgestoßen. Die nasalen retinalen Axone mit geringer EphA3-Expression machen andererseits Kontakte mit dem posterioren Tectum. Demnach projizieren retinale Axone mit geringer EphA3-Expression in Gebiete mit einer hohen Expressionsrate an EphrinA2-Liganden (Cheng et al., 1995; Drescher, 1997). Tatsächlich gestaltet sich das Modell der Lenkung der retinalen Axone auf dem Weg zum Tectum noch komplexer. Zum EphA3-Gradienten in der Retina kommen zwei weitere Gradienten von EphrinA2 und EphrinA5 hinzu. Zudem werden in der Retina auch die Rezeptoren EphA4 und EphA5 exprimiert, und im Tectum ein weiterer EphrinA5-Gradient, der von anterior nach posterior ansteigt (Flanagan und Vanderhaeghen, 1998). Folglich ist die Entwicklung der retinotectalen Projektion nicht nur von einer Rezeptor-Liganden-Kombination abhängig, sondern wird von einer Vielzahl von Eph-Rezeptoren und Ephrin-Liganden gleichzeitig beeinflusst. Dabei wird deutlich, wie wichtig es ist, diesen kombinierten Einfluss verschiedener Lenkungsmoleküle eingehender zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits die repulsive Wirkung von Sema3A sowie die attraktive Wirkung von Sema3C auf cortikale Axone dargestellt. Von besonderem Interesse war außerdem das Verhalten von cortikalen Axonen in diffusiblen und membrangebundenen Gradienten von Sema3A und Sema3C. So wird z.B. Sema3A im E16-Cortex in der VZ in einem Gradienten exprimiert, der von medial nach lateral ansteigt (Bürger, 2007). Das Wachstumsverhalten cortikaler Axone in Semaphorin-Gradienten wird in den nächsten Abschnitten diskutiert.

### 5.3.1. Cortikale Axone in diffusiblen Sema3A- und Sema3C-Gradienten

#### Abnehmende Sema3A-Konzentrationen wirken sich attraktiv auf die Axonlänge aus

Wie schon im Abschnitt 5.1. beschrieben verhalten sich cortikale Axone in zunehmenden Sema3A-Gradienten repulsiv. Dies äußert sich sowohl in der reduzierten Axonanzahl als auch in der herabgesetzten Axonlänge. In abnehmenden Sema3A-Gradienten erhöht sich dagegen die Anzahl der cortikalen Axone gegenüber der Kontrollsituation um rund ein Drittel. Auch die Axonlänge steigt im Vergleich zur Kontrolle um 32% an, so dass jeweils zwischen der Axonanzahl und Axonlänge in zunehmenden und abnehmenden Sema3A-Gradienten ein Unterschied von rund 60% bestand.

Eine mögliche Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse wäre, dass unter dem Einfluss von Sema3A die Axone vermehrt von der Sema3A-Quelle wegwuchsen, sie wurden umgelenkt. Dieser tropische Effekt des Sema3A auf cortikale Axone wurde bereits in einer früheren Veröffentlichung beschrieben (Bagnard et al., 1998). Warum aber waren die Axone, die in Richtung des abnehmenden Sema3A-Gradienten wuchsen, deutlich länger als im Kontrollexperiment? Der mögliche tropische Effekt auf die Wachstumsrichtung der Axone kann dies nicht erklären. Vielmehr könnte es sich um einen trophischen Einfluss auf die cortikalen Axone handeln. Dadurch, dass unter dem Einfluss des „repulsiven“ Sema3A vermehrt Axone von den Zellaggregaten weg wuchsen, könnten sich diese gegenseitig unterstützen und stabilisieren, beispielsweise durch Sekretion von wachstumsfördernden Faktoren. Folglich wäre dieser trophische Effekt um so größer, je mehr Axone auswachsen, und dies könnte einen positiven Einfluss auf die Axonlänge haben. Dies stellt einen Effekt der Explantatkultur dar, und somit hätte Sema3A nur indirekt Einfluss auf die axonale Länge. Abb. 4.6 im Ergebnisteil zeigt, dass ein trophischer Einfluss der Explantatkultur tatsächlich unabhängig von der Art des verwendeten Zellaggregates auftrat, und in beide Richtungen von den Zellaggregaten zu beobachten war. Dennoch lag die Regressionsgerade für die 3A-Zellaggregate weit über denen von 3C und der Kontrolle. Folglich ist also die Erhöhung der Länge von Fasern, die von einer Sema3A-Quelle weg wuchsen, nicht nur durch den trophischen Effekt allein zu erklären. Vielmehr lässt sich sagen, dass abnehmende Sema3A-Gradienten über die trophische Eigenschaft der Explantatkulturen hinaus, die cortikale Axonlänge erhöhte. Die Mechanismen, die vor allem intrazellulär einen attraktiven Effekt des „repulsiven“ Sema3A vermitteln, sind noch unklar. So könnte z.B. eine Hochregulierung von Neuropilin 2 oder eine Internalisierung von Neuropilin 1 für den attraktiven Effekt von Sema3A in abnehmenden Gradienten verantwortlich sein.

Die gegenseitige Unterstützung und Stabilisierung von auswachsenden Axonen und die damit verbundene Erhöhung der Axonlänge, könnte z.B. durch Sekretion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) erlangt werden. MMPs haben in sich entwickelnden Geweben vielfältige Funktionen und sind u.a. auch an der Axonlenkung beteiligt (Chang und Werb, 2001; Hattori et al., 2000; McFarlane, 2003). Gonthier et al. (2006) konnten zeigen, dass cortikale Axone an E15 MMP3 konstitutiv sezernieren. Nach Gabe eines MMP3-Inhibitors reduzierte sich die Axonlänge um 30% (Gonthier et al., 2007). Folglich könnte die trophische Erhöhung der Axonlänge in einer Explantatkultur auf einen mit der Axonanzahl korrelierten Anstieg der MMP3-Sekretion zurückzuführen sein.

Der Umkehrschluß wäre schließlich: Sind cortikale Axone, die auf eine Sema3A-Quelle zuwachsen, nur deshalb kürzer, weil weniger Axone auswachsen? Eine mögliche Antwort liefert Abb. 4.6 B), in der die Anzahl, der zu den Aggregaten wachsenden Axone gegen die axonale Länge aufgetragen ist. Zwar gibt es eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der auswachsenden Axone und deren Länge, aber bei Explantaten mit gleicher Anzahl von Fasern sind die Axone, die auf einen Sema3A-Gradienten zuwachsen immer kürzer als unter Kontrollbedingungen. Somit hat Sema3A tatsächlich einen inhibitorischen Effekt auf cortikale Axone, der nicht durch trophische Faktoren erklärt werden kann. Die Regressionsgerade für Sema3A-Aggregate liegt unter der von Sema3C und der Kontrolle, somit sind diese Axone generell kürzer als Axone unter Kontrollbedingungen. Zu bemerken wäre aber noch, dass der Effekt auf die axonale Länge in abnehmenden Sema3A-Gradienten sehr viel stärker ausgeprägt ist, als in zunehmenden Sema3A-Gradienten.

Ein anderes Bild ergibt sich, wenn man die Sema3C-Aggregate betrachtet. Wie Abb. 4.6 zeigt, sind die Regressionsgeraden von Axonen, die auf Sema3C-Aggregate zu wachsen oder wegwachsen nahezu identisch mit den Kontrollbedingungen. Zwar wachsen im Mittel mehr Axone auf Sema3C- als auf HEK-Aggregate zu, doch bei Explantaten mit gleicher Anzahl von Axonen sind diese bei Sema3C-Gradienten gleich lang wie unter Kontrollbedingungen. Sema3C scheint also nur einen deutlichen Effekt auf das Auswachsen der Axone zu haben, während der Einfluss auf die Axonlänge vielleicht nur auf trophische Effekte zurückzuführen ist. Um diese Frage genauer zu untersuchen, wurde deshalb der Einfluss von Sema3C auch auf Einzelzellen untersucht, bei denen die erwähnten trophischen Effekte weitgehend ausgeschaltet werden können.

### **5.3.2. Cortikale Axone von Einzelzellen in membrangebundenen Sema3A- und Sema3C-Gradienten zeigen Orientierungspräferenzen**

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt, orientierten sich auswachsende Axone cortikaler Einzelzellen auf membrangebundenen Sema3A-Gradienten bevorzugt zur geringeren

Sema3A-Konzentration. In einem Sema3C-Membrangradienten wuchsen die Axone dagegen bevorzugt zur höheren Sema3C-Konzentration. Diese Orientierungspräferenzen der kortikalen Axone in membrangebundenen Semaphorin-Gradienten entsprachen dem Wachstumsverhalten kortikaler Axone in diffusiblen Semaphorin-Gradienten. Die Orientierungspräferenz der kortikalen Axone in Richtung geringerer Sema3A-Membrankonzentration bzw. in Richtung zunehmender Sema3C-Membrankonzentration deutet zum einen auf einen richtungslenkenden Einfluss der beiden Klasse-3-Semaphorine hin. Zudem scheinen die graduell verteilten Semaphorine auch einen Einfluss auf die Polarität der kortikalen Neurone zu haben. Nach Präparation des kortikalen Gewebes und anschließender Trypsinierung liegen die kortikalen Neurone als einzelne Zellen vor und verfügen über keinerlei Fortsätze. In dieser Form werden die Neurone auf die Semaphorin-Gradienten aufgebracht. Bereits nach 24 h waren Axone und Dendriten ausgewachsen. Da die kortikalen Axone in den Sema3A- und Sema3C-Membrangradienten spezifische Orientierungspräferenzen zeigten, scheinen somit Sema3A und Sema3C die Axoninitiation sowie das gerichtete Axonwachstum maßgeblich zu beeinflussen. Obwohl für die Entstehung und Erhaltung der neuronalen Polarität ein intrinsisches Programm des Neurons verantwortlich ist, scheinen demnach auch extrazelluläre Signale auf die Neuronenpolarität zu wirken. Tatsächlich bestätigen einige *in-vitro*-Studien die Vermutung, dass Lenkungsmoleküle wie Netrin, Slit oder auch Sema3A die neuronale Polarität regulieren können (Adler et al., 2006; Halfter et al., 1985; Higginbotham et al., 2006; Yoshimura et al., 2006). So beschleunigte z.B. die Zugabe von Sema3A zu frisch kultivierten Spinalganglien der Maus die Ausbildung der neuronalen Polarität, die u.a. durch eine polarisierte Verteilung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionskomponenten charakterisiert ist (Lerman et al., 2007). Sema3A-Zugabe induzierte bei diesen Experimenten mit kultivierten Spinalganglien eine polarisierte Verteilung von GSK3 $\beta$ , einer Glykogen-Synthase-Kinase. Eine asymmetrische Akkumulation dieser Glykogen-Synthase-Kinase im Zellkörper wurde auch schon während der Entstehung der neuronalen Polarität von hippocampalen Axonen beobachtet (Gartner et al., 2006).

Neben dem Einfluss auf die Wachstumsrichtung der Axone durch die Semaphorine, war auch ein deutlicher Effekt auf die axonale Länge im Vergleich zum Kontrollexperiment zu verzeichnen. Die Fasern, die in Richtung eines absteigenden Sema3A-Membrangradienten wuchsen, waren signifikant länger als die der Kontrolle. Einem aufsteigenden Sema3A-Gradienten entlang wachsende Axone, waren dagegen signifikant kürzer als die Axone im Kontrollexperiment. Die Tatsache, dass kortikale Axone, die sich zu zunehmenden Sema3A-Konzentrationen orientieren, 25% kürzer sind als die Kontrolle, weist auf einen inhibitorischen Einfluss des membrangebundenen Sema3A hin. Dieser Effekt auf die Axonlänge von Einzelzellen bestätigt zudem die Unabhängigkeit des Sema3A-Effekt von



dem trophischen Einfluss der Explantate in der Co-Kultur. Demzufolge konnte die Sema3A-induzierte Repulsion, unabhängig von der Kultivierungsmethode, bei Explantaten und Einzelzellen nachgewiesen werden.

Die Versuche mit Sema3C-Membrangradienten waren dadurch gekennzeichnet, dass sich die Mehrzahl der kortikalen Axone zur höheren Membrankonzentration richtete. Diese Axone wiesen eine signifikant höhere Länge zum Kontrollexperiment auf. Dagegen waren Axone, die sich zur niederen Sema3C-Membrankonzentration orientierten, signifikant kürzer als die Kontrolle. Zunehmende Sema3C-Membrankonzentrationen hatten daher einen förderlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten kortikaler Axone. Der attraktive Einfluss von Sema3C auf die Axonlänge scheint daher als bewiesen, da bei der Kultivierung der Einzelzellen auf den Membrangradienten der trophische Effekt der Explantatkultur auf die Axonlänge nicht zum Tragen kam. Einzelzellen werden zwar auch in unmittelbarer Nähe zueinander kultiviert, dies scheint aber keine trophischen Effekte hervorzurufen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zunehmende Membrankonzentrationen von Sema3A repulsiv und zunehmende Konzentrationen von Sema3C attraktiv auf auswachsende kortikale Axone wirken. Diese Effekte von Sema3A und Sema3C werden durch Daten einer im Jahre 2000 veröffentlichten *in-vitro*-Studie mit Explantaten bestätigt (Bagnard et al., 2000).

Interessant war die annähernd gleiche Länge von kortikalen Axonen, die in Richtung eines absteigenden Sema3A-Membrangradienten sowie in Richtung eines aufsteigenden Sema3C-Membrangradienten wuchsen. In beiden Fällen war die Axonlänge signifikant größer als im Vergleich zum Kontrollexperiment. Da es sich um eine Erhöhung der Axonlänge im absteigenden Sema3A-Gradienten handelte, würde es bedeuten, dass abnehmende Konzentrationen eines inhibitorischen Moleküls auch positiv auf auswachsende kortikale Axone wirken können. Wie verhält es sich dann bei Sema3C? Wirken abnehmende Membrankonzentrationen vom wachstumsfördernden Sema3C dann inhibitorisch? Diese Vermutung liegt nahe, da Axone entlang des abnehmenden Sema3C-Membrangradienten im Vergleich zur Kontrolle signifikant kürzer waren. Dass abnehmende Konzentrationen des repulsiven Sema3A wachstumsfördernd auf auswachsende kortikale Axone wirken, scheint biologisch sinnvoll zu sein. Die geringe Anzahl von Axonen, die in Richtung zunehmender Sema3A-Gradienten wuchsen, bestätigt, dass zunehmende Gradienten von Sema3A einer Wachstumsbarriere gleichkommen. Das Wachstum in die Gegenrichtung, d.h. in Richtung abnehmender Sema3A-Gradienten und weg von der Wachstumsbarriere erscheint daher eine logische Schlussfolgerung zu sein. Wie aber erkennen auswachsende Axone ihre entsprechende Wachstumsrichtung, bzw. wie „lesen“ die Wachstumskegel Gradienten von Lenkungsmolekülen? Aus der Literatur ist zum einen bekannt, dass die Antwort der Axone auf Gradienten abhängig (Isbister et al., 2003; von Philipsborn et al., 2006) oder unabhängig (Bagnard et al., 2000; Rosentreter et al., 1998) von der Steilheit der Gradienten von

Lenkungsmolekülen sein kann. Die verwendeten Semaphorin-Membrangradienten hatten annähernd die gleiche Steilheit. Obwohl zwischen dem Beginn und dem Ende der Semaphorin-Gradienten teilweise ein 3-facher Konzentrationsunterschied an Membranen bestand, hatten die verschiedenen Sema3A- und Sema3C-Konzentrationen innerhalb der Gradienten stets den gleichen Effekt auf das Orientierungsverhalten der kortikalen Axone. Die Axonlänge variierte an den verschiedenen Punkten im Gradienten ebenfalls nicht. Folglich waren die Effekte auf das Orientierungsverhalten der Axone sowie auf deren Länge über große Bereiche der Gradienten unabhängig von der vorliegenden Semaphorin-Konzentration. Von Philipsborn et al. (2006) zeigten aber, dass auswachsende Axone verschiedenen steile Gradienten unterscheiden können. Die axonale Wegfindung orientiert sich aber nicht nur an der lokal vorliegenden Konzentration des Lenkungsmoleküls, sondern geschieht durch Verrechnung von Informationen über die lokale Konzentration sowie der bereits überschrittenen Konzentration an einem Lenkungsmolekül (von Philipsborn et al., 2006).

Ein wichtiger Mechanismus zur Orientierung von auswachsenden Axonen in Gradienten stellt die Adaptation dar. Durch fortschreitende Anpassung an vorliegende Konzentrationen eines Lenkungsmoleküls kann so die Sensitivität des Axons gegenüber eines Lenkungsmoleküls verringert werden. Eine Adaptation ist oft assoziiert mit einer Phase der Desensitivierung gefolgt von einer Resensitivierung, so auch bei dem Sema3A-induzierten Wachstumskegellkollaps retinaler Axone von *Xenopus* (Ferguson und Caron, 1998; Piper et al., 2005). Dabei tritt die Desensitivierung 2 min, und die Resensitivierung 5 min nach Sema3A-Einwirkung ein. Der Desensitivierung liegt eine Endozytose-abhängige Internalisierung von Neuropilin 1 von der Oberfläche des Wachstumskegels zugrunde, so dass zunächst kein Kollaps des Wachstumskegels erfolgt. Diese Rezeptor-Internalisierung scheint für die Reaktion des Wachstumskegels auf Sema3A sogar eine notwendige Voraussetzung zu sein (Castellani et al., 2004; Piper et al., 2005). Mittels Adaptation können sich so Wachstumskegel an grundlegend vorherrschende Sema3A-Konzentrationen anpassen und so angemessen auf steigende Sema3A-Gradienten reagieren. Inwieweit ein Adaptationsprozeß auch in abnehmenden Gradienten eine Rolle spielt, und welche Signalwege in der Zelle aktiviert werden, ist bisher unklar.

### **Cortikale Dendriten in membrangebundenen Sema3A-Gradienten**

Durch Polleux et al. (2000) wurde der chemoattraktive Einfluss von Sema3A auf kortikale Dendriten nachgewiesen. Da Sema3A in der MZ des sich entwickelnden Cortex exprimiert wird, richten sich apikale Dendriten von Neuronen in der CP zur Pia mater, d.h. zur zunehmenden Sema3A-Konzentration aus (Polleux et al., 2000). Entgegen dieser Studie wurde in der vorliegenden Arbeit kein Effekt von Sema3A auf kortikale Dendriten festgestellt,

was auf methodische Unterschiede zwischen beiden Arbeiten zurückzuführen sein könnte. Die Ausrichtung sowie die Länge cortikaler Dendriten in Sema3A-Membrangradienten entsprachen der Kontrollsituation. Polleux verwendete dagegen für seine *in-vitro*-Versuche die slice-overlay-Technik.

## **5.4. Der kombinatorische Einfluss von Sema3A und Sema3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone**

### **5.4.1. Sema3A-induzierte Repulsion dominiert über Sema3C-vermittelte Attraktion**

In sich entwickelnden Nervensystemen können Wachstumskegel von Axonen gleichzeitig auf verschiedene Lenkungsmoleküle treffen. So werden z.B. in der SVZ des E16-Cortex sowohl Sema3A als auch Sema3C exprimiert. Durch Diffusion der Semaphorin-Moleküle könnten z.B. in der IZ, in der afferente und efferente Fasern verlaufen, Sema3A und Sema3C präsent sein (Bayer und Altman, 1991; Bürger, 2007). Demnach könnte das Wachstumsverhalten von Axonen die Integration mehrerer Lenkungsmoleküle reflektieren. Verschiedene *in-vitro*-Studien belegten bereits, dass die Reaktion auf ein Lenkungsmolekül in Abhängigkeit von der Präsenz von anderen Lenkungsmolekülen variieren kann, und dass oftmals erst die relative Balance von zwei oder mehreren Lenkungsmolekülen zur Zielfindung von wachsenden Axone beiträgt (Dontchev und Letourneau, 2002; Ernst et al., 2000; Takahashi et al., 1998; Winberg et al., 1998a). Dontchev et al. 2003 zeigten beispielsweise, dass bei Kultivierung von Spinalganglien des Hühnchens und Zugabe von NGF, die Häufigkeit des Sema3A-induzierten Wachstumskegelkollaps abnahm. Somit reduzierte NGF die Wirksamkeit von Sema3A einen Kollaps zu induzieren. Bisher untersuchte die Mehrzahl der *in-vitro*-Studien die Wirkung von jeweils nur einem Semaphorin auf das Wachstumsverhalten von Axonen (Bagnard et al., 1998; de Castro et al., 1999; Messersmith et al., 1995). Daher war die Untersuchung des kombinatorischen Einflusses von Sema3A und Sema3C auf cortikale Axone von Interesse.

Die Sema3A- und Sema3C-sezernierenden Zelllinien wurden in verschiedenen Verhältnissen gemischt und in der Co-Kultur verwendet, um den Einfluss von diffusiblen Semaphorin-Gradienten aus Sema3A und Sema3C auf cortikale Axone zu untersuchen. Wie bereits dargestellt bewirkte pures Sema3A in zunehmenden Gradienten ein repulsives und in abnehmenden Gradienten ein attraktives Wachstumsverhalten der cortikalen Axone. Pures Sema3C induzierte in Richtung zunehmender Konzentrationen ein attraktives Wachstumsverhalten. Setzte sich ein Zellaggregat zur Hälfte aus Sema3A- und zur Hälfte aus Sema3C-sezernierenden Zellen zusammen, so war eine repulsive Reaktion der

cortikalen Axone zu beobachten, sie wuchsen vermehrt von der Semaphorin-Quelle weg. Der Semaphorin-Gradient wirkte sich auch noch bei 25%-igem Sema3A-Anteil und 75%-igem Sema3C-Anteil repulsiv aus. Konzentrationsabhängig sanken auch die Werte der Repulsion von  $-0,68$  bei puren Sema3A auf  $-0,47$  bei 25%-igem Sema3A-Anteil. Diese Beobachtungen stehen in Einklang zu Arbeiten von Takahashi et al. (1998). So induzierte Sema3A eine Repulsion von Axonen der Spinalganglien der Ratte und des Hühnchens. In Anwesenheit von Sema3C wurde die repulsive Aktivität von Sema3A dann reduziert. In der Veröffentlichung wurden aber keine genauen Mischungsverhältnisse der Semaphorin-sezernierenden Zellen angegeben (Takahashi et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit hob sich dagegen bei weiterer Reduzierung des Sema3A-Anteils auf 10% bzw. 5% die repulsive Wirkung des Semaphorin-Gradienten auf, die Explantate zeigten ein neutrales Wachstumsverhalten. Diese Co-Kultur-Experimente machen deutlich, dass Sema3A über Sema3C zu dominieren scheint. Folglich überwiegt auch bei einem ausbalancierten Verhältnis von Sema3A und Sema3C 50:50 die repulsive Wirkung des Semaphorin-Cocktails auf cortikale Axone. Noch deutlicher wird die Dominanz von Sema3A über Sema3C bei einem Verhältnis von Sema3A und Sema3C 25:75, bei dem ebenfalls ein repulsives Wachstumsverhalten der cortikalen Axone beobachtet werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei gleichzeitiger Präsenz von Sema3A und Sema3C, Sema3A den Sema3C-Rezeptor und damit eine Rezeptorbindung von Sema3C blockiert. Sema3A könnte nach dieser Überlegung als Antagonist an die Neuropilin 1-Homodimere und an die Heterodimere bestehend aus Neuropilin 1 und 2 binden. Die Mechanismen, die der Dominanz des repulsiven Effektes von Sema3A zugrunde liegen, könnten z.B. durch Bindungsstudien, die die Affinitäten der Semaphorine zu den verschiedenen Neuropilinen untersuchen, aufgeklärt werden.

#### **5.4.2. Bei gleichzeitigem Vorkommen von Sema3A und Sema3C entscheidet die jeweilige Konzentration über das Wachstumsverhalten der cortikalen Axone**

Um die Sema3A-Konzentration, die für ein Umschalten von einer repulsiven Reaktion in eine neutrale Reaktion notwendig ist, genauer zu definieren, wurden bei gleichbleibendem Sema3C-Gehalt und variierenden Sema3A-Gehalt weitere Experimente durchgeführt. Dazu standen die Sema3C\_3A- und die Sema3C\_3a-Zelllinie zur Verfügung. Beide Zelllinien wiesen einen Gehalt an Sema3C-Zellen von etwa 70% auf, nur im Sema3A-Gehalt unterschieden sie sich: 30% der Sema3C\_3A-Zellen sezernierten Sema3A, bei den Sema3C\_3a-Zellen waren es 20% der Zellen.

Die Durchführung von Co-Kultur und Streifenassay mit kortikalen Explantaten und den Membrangradienten mit Einzelzellen unter Verwendung der Sema3C\_3A-Zellen bzw. deren Membranen lässt übereinstimmend die Schlussfolgerung zu, dass ein 30%-iger Sema3A-Anteil gegenüber 70% Sema3C repulsive Reaktionen der kortikalen Axone hervorruft. In der Co-Kultur und im Streifenassay reduzierte ein diffusibler als auch ein membrangebundener Anteil von Sema3A von 30% die Axonanzahl und die Axonlänge. In Membrangradienten war dagegen nur ein Einfluss auf die Wachstumsrichtung der kortikalen Axone, und nicht auf die Axonlänge zu vermerken.

Ein 20%-iger Sema3A-Anteil hatte in der Co-Kultur hingegen keinen Einfluss auf die Wachstumsrichtung der Axone vom Explantat sowie auf deren Länge. Die Axone verhielten sich in diesem diffusiblen Semaphorin-Gradienten neutral. Dagegen war im Streifenassay und bei den Membrangradienten eine Tendenz zur Attraktion der kortikalen Axone zu beobachten. Auch in diesen Membrangradienten war kein Effekt auf die axonale Länge zu vermerken.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bei gleichbleibenden Sema3C-Gehalt ein Sema3A-Anteil von 30% durchweg repulsive Antworten der kortikalen Axone hervorruft. Ein 20%-iger Sema3A-Anteil induziert abhängig von der *in-vitro*-Methode neutrale oder attraktive Reaktionen. Da die Co-Kultur aber im Vergleich zu anderen *in-vitro*-Experimenten eher physiologischen Bedingungen zu entsprechen scheint (Harris et al., 1985), sollte sich an der neutralen Reaktion der Axone in der Co-Kultur orientiert werden. Die beiden Semaphorinmischungen unterschieden sich in ihrem Sema3A-Anteil um 10%. So ließe sich z.B. der richtungslenkende Einfluss der beiden Membranmischungen in den Membrangradienten durch den jeweiligen Sema3A-Anteil erklären. Mehr Sema3A-Anteil würde demnach einen repulsiven Einfluss auf kortikale Axone nach sich ziehen, weniger Sema3A-Anteil würde dagegen für eine Induzierung der Repulsion nicht genügen. Die Experimente legen nahe, dass die Konzentrationen der jeweiligen Lenkungsmoleküle Sema3A und Sema3C bei gleichzeitigem Vorkommen von großer Bedeutung sind. Der Vergleich mit spezifischen *in-vitro*-Experimenten gestaltet sich aber schwierig, da die Konzentrationen von Sema3A und Sema3C *in vivo* unbekannt sind.

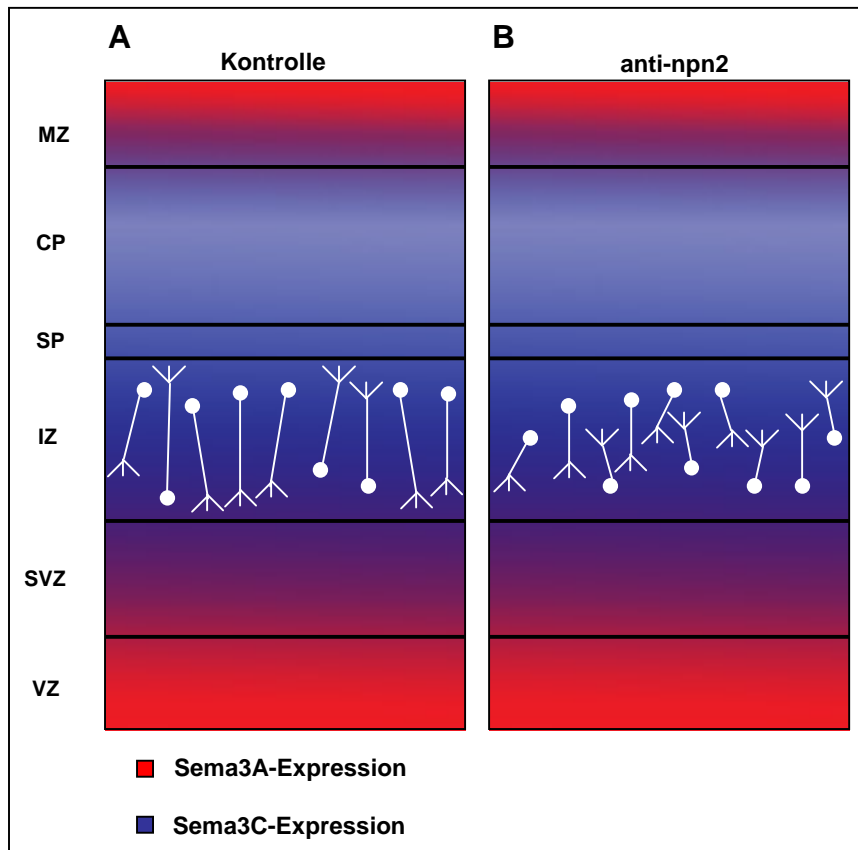
Bei der Wüstenheuschrecke *Schistocerca* wurde erstmalig die *in-vivo*-Funktion von Semaphorin-Gradienten bestätigt (Isbister et al., 2003; Isbister et al., 1999; Legg und O'Connor, 2003; Püschel, 1999). Ein Sema2a-Gradient im Epithel der Extremitätenknospe beeinflusst repulsiv das Auswachsen der Ti-Pionieraxone in proximale Richtung entlang der Extremitätenachse zum ZNS. Die Axone wachsen bis zum Ende des Sema2a-Gradienten in Richtung der Tr1-Zellen, die Sema1a exprimieren. Folglich ist ein Bereich der Coexpression von Sema2a und Sema1a vorhanden. Sema1a lenkt dann mittels kontaktvermittelter Attraktion die Axone in ventrale Richtung zum ZNS. Die lokale Coexpression von Sema2a

und Sema1a ist ein gutes Beispiel dafür, dass Semaphorine unabhängig voneinander und in Kombination wirken können, da es beim Blockieren der Sema2a- und Sema1a-Funktion jeweils allein oder in Kombination zu einer Fehlinnervation der Ti-Pionieraxone kommt. Aus diesem Grund bestätigen die vorliegende Arbeit und die *Schistocerca*-Studie, dass die Axonlenkung und die korrekte Zielinnervation von der relativen Balance multipler Lenkungsmoleküle abhängig sind. Das jeweilige Vorkommen multipler Semaphorine am Wachstumskegel und deren Balance zueinander tragen zur axonalen Lenkung bei. Inwieweit bei einer kombinierten Wirkung zweier Semaphorine die jeweiligen Semaphorin-Rezeptoren beteiligt sind und wie dann die intrazellulären Signalwege aussehen, ist noch nicht verstanden, weiterführende Experimente sollten dies analysieren.

### **5.5. Beeinflussung der efferenten cortikalen Projektionen durch Semaphorin-Neuropilin-Interaktionen im „slice overlay“-Assay**

Wie bereits in der Einleitung geschildert, werden Sema3A und Sema3C im embryonalen Cortex exprimiert, wenn cortikale Axone zu subcortikalen Targets projizieren. Gleichzeitig werden auch die Semaphorin-Rezeptoren durch cortikale Neurone exprimiert (Bayer und Altman, 1991; Bürger, 2007). Die vorliegende Arbeit belegt mit Hilfe verschiedener *in-vitro*-Experimente den repulsiven Einfluss von Sema3A, sowie den attraktiven Einfluss von Sema3C auf cortikale Axone. Zudem wurde auch die kombinierte Wirkung von Sema3A und Sema3C auf das Wachstumsverhalten cortikaler Axone analysiert. Um die funktionelle Rolle von Sema3A und Sema3C während der Entwicklung des Cortex besser zu verstehen, wurde als weiterer experimentieller Ansatz der „slice overlay“-Assay gewählt (Polleux und Ghosh, 2002). Der „slice overlay“-Assay zeichnet sich dadurch aus, dass als Substrat für cortikale Neurone embryonale Gehirnschnitte verwendet werden. Folglich können cortikale Neurone in einer *in-vivo*-ähnlichen Umgebung kultiviert werden. Ausgewählt als Substrat für cortikale Neurone (E16) wurden E16-Schnitte des Cortex, da die Expression von Sema3A und Sema3C zu diesem Zeitpunkt sehr komplex ist. Das Wachstumsverhalten der cortikalen Neuriten wurde in der IZ des Cortex analysiert, Abb. 5.2 gibt dazu einen Überblick.

Betrachtet man die Situation der Neurone in der IZ, so wird deutlich, dass die auswachsenden Fasern in der IZ sowohl unter dem Einfluss von Sema3A als auch von Sema3C stehen. Sema3A ist im E16-Cortex in der MZ, der SVZ und der VZ exprimiert. Sema3C ist dagegen in der kompletten SVZ zu finden (Bagnard et al., 1998; Bürger, 2007). Über dem Wege der Diffusion könnten so Sema3A und Sema3C aus der MZ, der VZ und der SVZ auch in die IZ gelangen. Folglich entsteht die Reaktion der auswachsenden Fasern aus einer Verarbeitung von repulsiven und attraktiven Signalen (Abb. 5.2).



**Abb. 5.2: Schematische Darstellung der „slice overlay“-Experimente mit kortikalen Schnitten (E16).** In der IZ des Cortex wurde das Wachstumsverhalten der aufgelagerten kortikalen Neurone analysiert. Die Sema3A-Expression ist in rot und die Sema3C-Expression in blau dargestellt. Durch Einwirkung von Sema3A und Sema3C wuchsen cortikale Axone in der IZ bevorzugt in Richtung der VZ. Nach Blockierung der attraktiven Wirkung von Sema3C wurde diese Orientierungspräferenz aufgehoben. MZ = Marginalzone, CP = cortikale Platte, SP = Subplatte, IZ = Intermediärzone, SVZ = Subventrikularzone, VZ = Ventrikularzone.

Hinsichtlich des Orientierungsverhaltens unter Kontrollbedingungen wuchs die große Mehrzahl (66%) der analysierten Neuriten in Richtung der VZ, die anderen Neuriten (34%) orientierten sich zur CP. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits in einer Studie präsentiert (Polleux et al., 1998). Die Länge der Fasern war in beide Richtungen ungefähr gleich, sie betrug rund 60  $\mu\text{m}$ . Nach anti-npn2-Zugabe (Antikörper gegen Neuropilin 2) war dagegen keine bevorzugte Wachstumsrichtung der Neuriten mehr zu beobachten, 52% der Neuriten wuchsen zur CP und 48% zur VZ. Zudem war die Faserlänge von rund 60  $\mu\text{m}$  in der Kontrollsituation auf rund 36  $\mu\text{m}$  in beide Richtungen reduziert (Abb. 5.2).

Da sich unter Kontrollbedingungen die Mehrzahl der Fasern in Richtung der VZ orientierte, dominierte die von den Schichten unterhalb der IZ ausgehende attraktive Wirkung des Sema3C auf auswachsende cortikale Fasern über der repulsiven Wirkung von Sema3A. Nach Blockierung der Sema3C-Bindestelle Neuropilin 2 durch einen Antikörper, wurde die Orientierungspräferenz der cortikalen Fasern in Richtung der VZ aufgehoben. Wie im Abschnitt 5.2.1. dargestellt, vermittelt Neuropilin 2 die Sema3C-induzierte Attraktion. Demnach wurde nach Antikörperzugabe der von den unteren Schichten ausgehende

attraktive Einfluss von Sema3C auf die Fasern gehemmt oder aufgehoben. Dafür spricht auch, dass die Fasern ohne den attraktiven Einfluss von Sema3C kürzer sind als unter Kontrollbedingungen. Da die Fasern zudem in beide Richtungen, zur CP oder zur VZ, gleich kurz sind, liegt die Vermutung nahe, dass sowohl Sema3A aus der MZ als auch Sema3A aus der VZ bzw. SVZ die Länge der Fasern reduziert. Warum aber sind unter Kontrollbedingungen die Fasern in beide Richtungen gleich lang, obwohl in diesem Fall die attraktive Wirkung von Sema3C zu überwiegen scheint? Eine Antwort liefern die Gradienten-Experimente mit gemischten Sema3A- und Sema3C-Membranen. Eine Kombination von Sema3A und Sema3C hatte zwar einen Einfluss auf die Orientierung der Axone im Gradienten, nicht aber auf die Länge der Axone. Sie war in Richtung der auf- und absteigenden Gradienten nicht verschieden.

## 5.6. Ausblick: Weiterführende Studien

Die vorgestellten Ergebnissen konnten für cortikale Axone die Beteiligung von Sema3A und Sema3C an der axonalen Lenkung belegen. Es war u.a. möglich, die durch Sema3C vermittelte Attraktion auf cortikale Axone durch Blockierung von Neuropilin 2, der Sema3C-Bindungsstelle am Sema3C-Rezeptor, aufzuheben bzw. in eine Repulsion zu konvertieren. In weiterführenden Experimenten könnte die Rezeptorbeteiligung bei dem attraktiven bzw. repulsiven Effekt auf cortikale Axone für Neuropilin 1 und verschiedene A-Plexine und Plexin D1 getestet werden. Dies könnte mit Hilfe von funktionell blockierenden Antikörpern in der Co-Kultur und/oder den Membrangradienten untersucht werden. Die vorliegende Arbeit konnte zudem eine unbekannte Funktion von Sema3A aufzeigen: Sema3A wirkt in der Co-Kultur mit corticalen Explantaten in abnehmenden Konzentrationen attraktiv auf auswachsende Axone. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die attraktive Wirkung von Sema3A in abnehmenden Gradienten durch eine Hochregulierung von Neuropilin 2-Expression verursacht wird. Um dies zu klären sollte z.B. an corticalen Neuronen auf Semaphorin-Membrangradienten eine quantitative Immunhistochemie gegen Neuropilin 2 durchgeführt werden. Dazu sollten die Neurone zum einen nicht permeabilisiert werden, um die Neuropilin-Rezeptoren an der Zelloberfläche nachzuweisen. Zum anderen sollte eine Permeabilisierung der Neurone erfolgen, so dass zudem die möglicherweise internalisierten Rezeptoren detektiert werden können.

Die Co-Kultur betreffend könnte der trophische Einfluss der Explantatkultur und eine mögliche Beteiligung von MMPs genauer untersucht werden. Werden MMPs sezerniert und haben diese einen Einfluss auf die Axonlänge? Was geschieht bezüglich der MMPs unter Sema3A- bzw. Sema3C-Einfluss? Die Arbeitsgruppe von Dominique Bagnard zeigte bereits eine MMP3-Aktivität im sich entwickelnden Cortex (Gonthier et al., 2007).



Desweiteren sollte der Einfluss von Sema3A und Sema3C auf die Ausbildung der neuronalen Polarität weiter untersucht werden. Lerman et al. (2007) demonstrierten z.B., dass für die Sema3A-induzierte Neuronenpolarität eine polarisierte Lokalisation bzw. Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskomponenten, wie Rac1 (G-Protein) und GSK3 $\beta$  (Glykogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ) charakteristisch ist. Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises sollte deshalb überprüft werden, ob und auf welche Art und Weise cortikale Neurone in einem Sema3A-Gradienten die Komponenten dieses Signaltransduktionsweges akkumulieren.

Schließlich gaben die Ergebnisse des „slice overlay“-Assays Aufschluß über die kombinatorische Wirkung von Sema3A und Sema3C innerhalb physiologischer Konzentrationen auf das Wachstumsverhalten von cortikalen Axonen. Das Ausschalten der attraktiven Wirkung von Sema3C durch Blockierung von Neuropilin 2 mit einem Antikörper wurde bereits untersucht. Auf gleiche Weise sollten Neuropilin 1 oder verschiedene Plexine blockiert werden, um die kombinatorische Wirkung zweier Lenkungsmoleküle besser zu verstehen.

## 6. Zusammenfassung

---

Während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems müssen auswachsende Axone den korrekten Weg zu ihrer Zielstruktur im Gehirn finden. Verschiedene axonale Lenkungsmoleküle, membrangebunden oder diffusibel, steuern die Navigation der wachsenden Axone. Vorangehende *in-vitro*-Studien bestätigten bereits, dass den Semaphorinen eine entscheidende Funktion während diesen frühen Entwicklungsstadien des Gehirns zukommt. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe Bolz zeigten, dass sowohl Semaphorin 3A (Sema3A) als auch Semaphorin 3C (Sema3C) während der Entwicklung der kortikalen Projektionen als axonale Lenkungsmoleküle fungieren (Bagnard et al., 1998; Bagnard et al., 2000). Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es daher, die Effekte von membrangebundenen und diffusiblen Sema3A bzw. Sema3C auf cortikale Axone genauer zu untersuchen, und das Verhalten der Fasern in Semaphorin-Gradienten zu analysieren.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass homogen verteiltes membrangebundenes Sema3A repulsiv auf cortikale Axone wirkt. In Gegenwart von Sema3A wuchsen in den *in-vitro*-Experimenten weniger cortikale Axone aus, zudem reduzierte sich ihre Länge. Im Gegensatz dazu wirkte sich Sema3C attraktiv auf auswachsende cortikale Axone aus und führte zu einer Steigerung der Axonanzahl und der Axonlänge.

Dass Sema3A nicht nur repulsive Effekte vermittelt, zeigten die Gradienten-Experimente. Abnehmende Semaphorin-Konzentrationen beeinflussten das axonale Wachstumsverhalten maßgeblich. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass abnehmende Sema3A-Konzentrationen die axonale Länge erhöhten. Damit wurde ein neuer Mechanismus der Axonlenkung nachgewiesen: abnehmende Konzentrationen eines repulsiven Lenkungsmoleküls können auch attraktiv wirken. Folglich ist Sema3A als bifunktionelles axonales Lenkungsmolekül einzustufen. Diffusiblen wie membrangebundenen Sema3A-Gradienten war gemeinsam, dass sich cortikale Axone bevorzugt in Richtung der abnehmenden Gradienten orientierten. Bei Sema3C-Gradienten war die Wachstumsrichtung dagegen bevorzugt zu steigenden Sema3C-Konzentrationen gerichtet. Demnach zeigt die vorliegende Arbeit, dass räumliche Gradienten von Semaphorinen das Axonwachstum beeinflussen können. Somit hatten Sema3A und Sema3C einen Einfluss auf die Ausbildung der Polarität von cortikalen Neuronen, d. h. die Axonbildung und das gerichtete Axonwachstum wird von den beiden Lenkungsmolekülen reguliert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass durch Bindung von Sema3C an Neuropilin 2, der Sema3C-Bindungsstelle am Semaphorin-Rezeptor, der attraktive Effekt vermittelt wurde. Darüber hinaus wurde bei Blockierung von Neuropilin 2 in der Co-Kultur die Sema3C-

induzierte Attraktion in eine Repulsion konvertiert. Folglich wurde in dieser Arbeit Neuropilin 2 als molekularer Schalter von Attraktion *versus* Repulsion im Signalweg von Sema3C identifiziert.

Erstmals wurde in dieser Arbeit die kombinatorische Wirkung von Sema3A und Sema3C untersucht. Demnach scheint die repulsive Wirkung von Sema3A über der attraktiven von Sema3C zu dominieren. Dies bestätigen die Co-Kultur-Experimente, da bei einer Mischung der Semaphorin-sezernierenden Zelllinien von Sema3A und Sema3C im Verhältnis 50:50 sowie 75:25, ein repulsives Wachstumsverhalten der kortikalen Axone beobachtet wurde.

Der „slice overlay“-Assay wurde genutzt, um die Beteiligung der beiden Semaphorine während der Entstehung kortikaler Projektionen in einer *in-vivo*-ähnlichen Situation genauer zu untersuchen. Durch Einwirkung von Sema3A und Sema3C wuchsen kortikale Axone in der Intermediärzone des Cortex bevorzugt in Richtung der Ventrikularzone. Nach Blockierung der attraktiven Wirkung von Sema3C wurde diese Orientierungspräferenz aufgehoben. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die korrekte Axonlenkung erst durch die Balance multipler Lenkungsmoleküle möglich ist.

Methodisch konnte die Arbeit, die Kultivierung der kortikalen Explantate betreffend, einen trophischen Effekt nachweisen. Dabei bestand eine positive Korrelation zwischen Axonanzahl und Axonlänge, mit steigender Axonanzahl nahm also die Länge der Axone zu. Die Effekte der Semaphorine blieben dabei unbeeinflusst.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass den Lenkungsmolekülen Sema3A und Sema3C während der Entwicklung kortikaler Projektionen multiple Funktionen zugeschrieben werden können. Die vorliegende Arbeit konnte eine Beteiligung von Sema3A und Sema3C an der Axoninitiierung sowie eine Beeinflussung des axonalen Wachstumsverhaltens aufzeigen. Die *in-vitro*-Experimente legen aber auch nahe, dass die kortikale Axonlenkung erst durch die Integration beider Lenkungsmoleküle zur korrekten Zielstruktur führen kann.

## 7. Summary

---

During development of the nervous system growing axons have to find correct pathways in order to reach the appropriate region of the brain. Different molecules, membrane bound or secreted, are involved to navigate growing axons toward their target region. Members of the secreted class 3 semaphorin protein family have been implicated in mediating axonal guidance. Previous *in-vitro*-studies with growing cortical axons demonstrated a repulsive and an attractive guidance effect for semaphorin 3A (Sema3A) and semaphorin 3C (Sema3C) respectively. Furthermore, Sema3A and Sema3C show a complex expression pattern in developing cortex (Bagnard et al., 1998). Attempt of the current thesis was to examine the influence of membrane bound and secreted Sema3A and Sema3C on cortical axons, and to analyse axonal growth behavior in semaphorin gradients.

This doctoral thesis could confirm a repulsive effect of homogenous distributed membrane bound Sema3A on cortical axons. In presence of Sema3A the number of axons extending from the cortical explants was reduced. In addition, length of cortical axons was decreased. In contrast to Sema3A, Sema3C had an attractive influence on cortical axons. Sema3C led to an increase in axon number and axon length. This attractive effect was mediated by neuropilin 2, the Sema3C binding site belonging to the Sema3C receptor. Moreover, after inhibition of neuropilin 2, the Sema3C-induced attractive effect on cortical axons was converted into a repulsive effect on cortical axons. Accordingly, neuropilin 2 was identified as a molecular switch between attraction and repulsion in the signal transduction pathway of Sema3C.

In soluble and membrane bound Sema3A gradients cortical axons preferred to grow towards decreasing semaphorin concentrations (downhill the gradient). In contrast, in Sema3C gradients most cortical axons were oriented towards increasing semaphorin concentrations (uphill the gradient). Thus, spatial gradients of semaphorins can influence cortical axon behavior and the formation of the neuronal polarization, i.e. the initiation of the axon and the directional axon growth can be regulated by Sema3A and Sema3C. For the first time this thesis could prove that decreasing Sema3A concentrations enhance axon length. Therewith, a new mechanism in axonal guidance could be evinced: decreasing concentrations of a repulsive guidance cue can have attractive effects on growing axons.

Moreover, co-culture experiments with a mixture of Sema3A- and Sema3C-secreting cell aggregates showed, that the repulsive effect of Sema3A dominates over the attractive effect of Sema3C. If the soluble gradients consisted of Sema3A and Sema3C at a ratio of 50:50 or 75:25, cortical axons were repulsed of increasing semaphorin concentrations.

Finally, to examine the function of both secreted semaphorins during the development of cortical projections, the slice overlay assay was utilized. Through the combinational action of Sema3A and Sema3C most cortical axons grew in the intermediate zone of the developing cortex towards the ventricular zone. After blocking the attractive effect of Sema3C with an antibody against neuropilin 2, the preferred growth direction was abolished. These results confirm, that an accurate axonal guidance is provided by a balance of several guidance cues.

In summary, Sema3A and Sema3C have multiple functions during the cortical development. This current thesis could confirm the involvement of Sema3A and Sema3C in neuronal polarization and the influence of both semaphorins on axonal growth behavior. Attractive as well as repulsive effects of Sema3C and Sema3A were revealed. The different *in-vitro*-experiments suggest that axonal guidance is realized by integration of multiple guidance cues.

## 8. Literaturverzeichnis

---

- Adams, R. H., Lohrum, M., Klostermann, A., Betz, H., und Puschel, A. W. (1997). The chemorepulsive activity of secreted semaphorins is regulated by furin-dependent proteolytic processing. *EMBO J* 16, 6077-6086.
- Adler, C. E., Fetter, R. D., und Bargmann, C. I. (2006). UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nat Neurosci* 9, 511-518.
- Anderson, S. A., Marin, O., Horn, C., Jennings, K., und Rubenstein, J. L. (2001). Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. *Development* 128, 353-363.
- Angevine, J. B., und Sidman, R. L. (1961). Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. *Nature* 192, 766-768.
- Artigiani, S., Conrotto, P., Fazzari, P., Gilestro, G. F., Barberis, D., Giordano, S., Comoglio, P. M., und Tamagnone, L. (2004). Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO Rep* 5, 710-714.
- Bagnard, D., Chounlamountri, N., Puschel, A. W., und Bolz, J. (2001). Axonal surface molecules act in combination with semaphorin 3a during the establishment of corticothalamic projections. *Cereb Cortex* 11, 278-285.
- Bagnard, D., Lohrum, M., Uziel, D., Puschel, A. W., und Bolz, J. (1998). Semaphorins act as attractive and repulsive guidance signals during the development of cortical projections. *Development* 125, 5043-5053.
- Bagnard, D., Thomasset, N., Lohrum, M., Puschel, A. W., und Bolz, J. (2000). Spatial distributions of guidance molecules regulate chemorepulsion and chemoattraction of growth cones. *J Neurosci* 20, 1030-1035.
- Baier, H., und Klostermann, S. (1994). Axon guidance and growth cone collapse in vitro. *Neuroprotocols: A Companion to Methods in Neurosciences* 4, 96-105.
- Bayer, S. A., und Altman, J. (1991). *Neocortical Development* (New York, Raven Press).
- Behar, O., Golden, J. A., Mashimo, H., Schoen, F. J., und Fishman, M. C. (1996). Semaphorin III is needed for normal patterning and growth of nerves, bones and heart. *Nature* 383, 525-528.
- Bolz, J., und Castellani, V. (1997). How do wiring molecules specify cortical connections? *Cell Tissue Res* 290, 307-314.
- Bradke, F., und Dotti, C. G. (2000a). Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. *Curr Biol* 10, 1467-1470.
- Bradke, F., und Dotti, C. G. (2000b). Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* 10, 574-581.
- Brambilla, E., Constantin, B., Drabkin, H., und Roche, J. (2000). Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am J Pathol* 156, 939-950.
- Brose, K., Bland, K. S., Wang, K. H., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., und Kidd, T. (1999). Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 96, 795-806.
- Bürger, S. (2007) Analyse der Expression der Verdrahtungsmoleküle der Semaphorin/Neuropilin/ Plexin Familie während der thalamokortikalen Entwicklung der Maus, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Cajal, R. (1892). La rétine de vertébrés. *La Cellule* 9, 121-258.
- Caroni, P. (1998). Driving the growth cone. *Science* 281, 1465-1466.
- Castellani, V. (2002). The function of neuropilin/L1 complex. *Adv Exp Med Biol* 515, 91-102.
- Castellani, V., Chedotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., und Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Semaphorin 3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* 27, 237-249.

- Castellani, V., Falk, J., und Rougon, G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol Cell Neurosci* 26, 89-100.
- Castellani, V., Yue, Y., Gao, P. P., Zhou, R., und Bolz, J. (1998). Dual action of a ligand for Eph receptor tyrosine kinases on specific populations of axons during the development of cortical circuits. *J Neurosci* 18, 4663-4672.
- Caviness, V. S., Jr., und Frost, D. O. (1980). Tangential organization of thalamic projections to the neocortex in the mouse. *J Comp Neurol* 194, 335-367.
- Chang, C., und Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 11, S37-43.
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M. C., Jessell, T. M., Henderson, C. E., und Mann, F. (2007). Gating of Semaphorin3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* 56, 807-822.
- Chedotal, A., Del Rio, J. A., Ruiz, M., He, Z., Borrell, V., de Castro, F., Ezan, F., Goodman, C. S., Tessier-Lavigne, M., Sotelo, C., und Soriano, E. (1998). Semaphorins III and IV repel hippocampal axons via two distinct receptors. *Development* 125, 4313-4323.
- Chen, G., Sima, J., Jin, M., Wang, K. Y., Xue, X. J., Zheng, W., Ding, Y. Q., und Yuan, X. B. (2008). Semaphorin-3A guides radial migration of cortical neurons during development. *Nat Neurosci* 11, 36-44.
- Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S., und Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* 19, 547-559.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A., und Tessier-Lavigne, M. (1998). Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* 21, 1283-1290.
- Cheng, H. J., Nakamoto, M., Bergemann, A. D., und Flanagan, J. G. (1995). Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell* 82, 371-381.
- Chilton, J. K. (2006). Molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 292, 13-24.
- Christensen, C. R., Klingelhofer, J., Tarabykina, S., Hulgaard, E. F., Kramerov, D., und Lukanidin, E. (1998). Transcription of a novel mouse semaphorin gene, M-semaH, correlates with the metastatic ability of mouse tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 1238-1244.
- Colamarino, S. A., und Tessier-Lavigne, M. (1995). The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81, 621-629.
- Craig, A. M., und Banker, G. (1994). Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17, 267-310.
- de Castro, F., Hu, L., Drabkin, H., Sotelo, C., und Chedotal, A. (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J Neurosci* 19, 4428-4436.
- Dickson, B. J. (2002). Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.
- Ding, S., Luo, J. H., und Yuan, X. B. (2007). Semaphorin-3F attracts the growth cone of cerebellar granule cells through cGMP signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 356, 857-863.
- Dontchev, V. D., und Letourneau, P. C. (2002). Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *J Neurosci* 22, 6659-6669.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A., und Banker, G. A. (1988). The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8, 1454-1468.
- Drescher, U. (1997). The Eph family in the patterning of neural development. *Curr Biol* 7, R799-807.
- Drescher, U., Kremoser, C., Handwerker, C., Loschinger, J., Noda, M., und Bonhoeffer, F. (1995). In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell* 82, 359-370.

- Elhabazi, A., Marie-Cardine, A., Chabbert-de Ponnat, I., Bensussan, A., und Boursnell, L. (2003). Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Crit Rev Immunol* 23, 65-81.
- Ernst, A. F., Gallo, G., Letourneau, P. C., und McLoon, S. C. (2000). Stabilization of growing retinal axons by the combined signaling of nitric oxide and brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 20, 1458-1469.
- Esch, T., Lemmon, V., und Banker, G. (1999). Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 6417-6426.
- Falk, J., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., Puschel, A. W., *et al.* (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* 48, 63-75.
- Fenstermaker, V., Chen, Y., Ghosh, A., und Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic length and branching by semaphorin 3A. *J Neurobiol* 58, 403-412.
- Ferguson, S. S., und Caron, M. G. (1998). G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* 9, 119-127.
- Fiore, R., und Puschel, A. W. (2003). The function of semaphorins during nervous system development. *Front Biosci* 8, s484-499.
- Flanagan, J. G., und Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* 21, 309-345.
- Fu, S. Y., Sharma, K., Luo, Y., Raper, J. A., und Frank, E. (2000). SEMA3A regulates developing sensory projections in the chicken spinal cord. *J Neurobiol* 45, 227-236.
- Fukata, Y., Kimura, T., und Kaibuchi, K. (2002). Axon specification in hippocampal neurons. *Neurosci Res* 43, 305-315.
- Gartner, A., Huang, X., und Hall, A. (2006). Neuronal polarity is regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 $\beta$ ) independently of Akt/PKB serine phosphorylation. *J Cell Sci* 119, 3927-3934.
- Giger, R. J., Urquhart, E. R., Gillespie, S. K., Levensgood, D. V., Ginty, D. D., und Kolodkin, A. L. (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* 21, 1079-1092.
- Gilbert, C. D. (1983). Microcircuitry of the visual cortex. *Annu Rev Neurosci* 6, 217-247.
- Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., und Comoglio, P. M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-724.
- Gitler, A. D., Lu, M. M., und Epstein, J. A. (2004). PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev Cell* 7, 107-116.
- Gonthier, B., Nasarre, C., Roth, L., Perraut, M., Thomasset, N., Roussel, G., Aunis, D., und Bagnard, D. (2007). Functional interaction between matrix metalloproteinase-3 and semaphorin-3C during cortical axonal growth and guidance. *Cereb Cortex* 17, 1712-1721.
- Goodhill, G. J. (1998). Mathematical guidance for axons. *Trends Neurosci* 21, 226-231.
- Goodman, C. S. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci* 19, 341-377.
- Götz, M., Novak, N., Bastmeyer, M., und Bolz, J. (1992). Membrane-bound molecules in rat cerebral cortex regulate thalamic innervation. *Development* 116, 507-519.
- Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D. V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C. E., Jessell, T. M., Kolodkin, A. L., und Ginty, D. D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* 307, 265-268.
- Gundersen, R. W., und Barrett, J. N. (1979). Neuronal chemotaxis: chick dorsal-root axons turn toward high concentrations of nerve growth factor. *Science* 206, 1079-1080.
- Guthrie, S., und Lumsden, A. (1994). Collagen gel coculture of neural tissue. *Neuroprotocols: A Companion to Methods in Neurosciences* 4, 116-120.
- Halfter, W., Deiss, S., und Schwarz, U. (1985). The formation of the axonal pattern in the embryonic avian retina. *J Comp Neurol* 232, 466-480.



- Harris, W. A., Holt, C. E., Smith, T. A., und Gallenson, N. (1985). Growth cones of developing retinal cells in vivo, on culture surfaces, and in collagen matrices. *J Neurosci Res* 13, 101-122.
- Hattori, M., Osterfield, M., und Flanagan, J. G. (2000). Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289, 1360-1365.
- He, Z., und Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* 90, 739-751.
- He, Z., Wang, K. C., Koprivica, V., Ming, G., und Song, H. J. (2002). Knowing how to navigate: mechanisms of semaphorin signaling in the nervous system. *Sci STKE* 2002, RE1.
- Higginbotham, H., Tanaka, T., Brinkman, B. C., und Gleeson, J. G. (2006). GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol Cell Neurosci* 32, 118-132.
- Höpker, V. H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., und Holt, C. (1999). Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.
- Horton, A. C., und Ehlers, M. D. (2003). Neuronal polarity and trafficking. *Neuron* 40, 277-295.
- Hubel, D. H., und Wiesel, T. N. (1963). Shape and arrangement of columns in cats striate cortex. *Journal of Physiology* 165, 559-568.
- Hübener, M., Götz, M., Klostermann, S., und Bolz, J. (1995). Guidance of thalamocortical axons by growth-promoting molecules in developing rat cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience* 7, 1963-1972.
- Isbister, C. M., Mackenzie, P. J., To, K. C., und O'Connor, T. P. (2003). Gradient steepness influences the pathfinding decisions of neuronal growth cones in vivo. *J Neurosci* 23, 193-202.
- Isbister, C. M., Tsai, A., Wong, S. T., Kolodkin, A. L., und O'Connor, T. P. (1999). Discrete roles for secreted and transmembrane semaphorins in neuronal growth cone guidance in vivo. *Development* 126, 2007-2019.
- Kennedy, T. E., Serafini, T., de la Torre, J. R., und Tessier-Lavigne, M. (1994). Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* 78, 425-435.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K. J., Fetter, R. D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., und Tear, G. (1998). Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.
- Kiryushko, D., Berezin, V., und Bock, E. (2004). Regulators of neurite outgrowth: role of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 140-154.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., und Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995-1005.
- Kobayashi, H., Koppel, A. M., Luo, Y., und Raper, J. A. (1997). A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J Neurosci* 17, 8339-8352.
- Kolodkin, A. L. (1996). Semaphorins: mediators of repulsive growth cone guidance. *Trends Cell Biol* 6, 15-22.
- Kolodkin, A. L., Levengood, D. V., Rowe, E. G., Tai, Y. T., Giger, R. J., und Ginty, D. D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* 90, 753-762.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., und Goodman, C. S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389-1399.
- Kolodkin, A. L., Matthes, D. J., O'Connor, T. P., Patel, N. H., Admon, A., Bentley, D., und Goodman, C. S. (1992). Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9, 831-845.
- Koncina, E., Roth, L., Gonthier, B., und Bagnard, D. (2007). Role of Semaphorins during axon growth and guidance. In *Axon growth and guidance*. D. Bagnard, ed. (Landes Bioscience and Springer Science), pp. 50-64.
- Kreyszig, E. (1979). *Statistische Methoden und ihre Anwendungen*, 7 edn (Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht).

- Kruger, R. P., Aurandt, J., und Guan, K. L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 789-800.
- Kumanogoh, A., und Kikutani, H. (2003). Immune semaphorins: a new area of semaphorin research. *J Cell Sci* 116, 3463-3470.
- Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., *et al.* (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621-631.
- Landis, S. C. (1983). Neuronal growth cones. *Annu Rev Physiol* 45, 567-580.
- Legg, A. T., und O'Connor, T. P. (2003). Gradients and growth cone guidance of grasshopper neurons. *J Histochem Cytochem* 51, 445-454.
- Lein, P. J., und Higgins, D. (1989). Laminin and a basement membrane extract have different effects on axonal and dendritic outgrowth from embryonic rat sympathetic neurons in vitro. *Dev Biol* 136, 330-345.
- Lerman, O., Ben-Zvi, A., Yagil, Z., und Behar, O. (2007). Semaphorin3A accelerates neuronal polarity in vitro and in its absence the orientation of DRG neuronal polarity in vivo is distorted. *Mol Cell Neurosci* 36, 222-234.
- Li, H. S., Chen, J. H., Wu, W., Fagaly, T., Zhou, L., Yuan, W., Dupuis, S., Jiang, Z. H., Nash, W., Gick, C., *et al.* (1999). Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell* 96, 807-818.
- Lilienbaum, A., Reszka, A. A., Horwitz, A. F., und Holt, C. E. (1995). Chimeric integrins expressed in retinal ganglion cells impair process outgrowth in vivo. *Mol Cell Neurosci* 6, 139-152.
- Lumsden, A. G., und Davies, A. M. (1983). Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 306, 786-788.
- Luo, Y., Raible, D., und Raper, J. A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217-227.
- Mann, F., Peuckert, C., Dehner, F., Zhou, R., und Bolz, J. (2002). Ephrins regulate the formation of terminal axonal arbors during the development of thalamocortical projections. *Development* 129, 3945-3955.
- Mann, F., Zhukareva, V., Pimenta, A., Levitt, P., und Bolz, J. (1998). Membrane-associated molecules guide limbic and nonlimbic thalamocortical projections. *J Neurosci* 18, 9409-9419.
- Marin, O., und Rubenstein, J. L. (2001). A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* 2, 780-790.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., und Rubenstein, J. L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872-875.
- McFarlane, S. (2003). Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* 37, 559-562.
- Messersmith, E. K., Leonardo, E. D., Shatz, C. J., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C. S., und Kolodkin, A. L. (1995). Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron* 14, 949-959.
- Ming, G., Henley, J., Tessier-Lavigne, M., Song, H., und Poo, M. (2001). Electrical activity modulates growth cone guidance by diffusible factors. *Neuron* 29, 441-452.
- Moore, S. W., Tessier-Lavigne, M., und Kennedy, T. E. (2007). Netrins and their receptors. In *Axon growth and guidance*. D. Bagnard, ed. (Landes Bioscience and Springer Science), pp. 17-31.
- Muller, B., Stahl, B., und Bonhoeffer, F. (1990). In vitro experiments on axonal guidance and growth-cone collapse. *J Exp Biol* 153, 29-46.
- Nadarajah, B. (2003). Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia* 43, 33-36.
- Nadarajah, B., Alifragis, P., Wong, R. O., und Parnavelas, J. G. (2003). Neuronal migration in the developing cerebral cortex: observations based on real-time imaging. *Cereb Cortex* 13, 607-611.

- Nadarajah, B., und Parnavelas, J. G. (2002). Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 3, 423-432.
- Nakamura, F., Kalb, R. G., und Strittmatter, S. M. (2000). Molecular basis of semaphorin-mediated axon guidance. *J Neurobiol* 44, 219-229.
- Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R. G., und Strittmatter, S. M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* 21, 1093-1100.
- Negishi, M., Oinuma, I., und Kato, H. (2005). Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 62, 1363-1371.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., und Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319.
- Pini, A. (1993). Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system. *Science* 261, 95-98.
- Piper, M., Salih, S., Weinl, C., Holt, C. E., und Harris, W. A. (2005). Endocytosis-dependent desensitization and protein synthesis-dependent resensitization in retinal growth cone adaptation. *Nat Neurosci* 8, 179-186.
- Polleux, F., und Ghosh, A. (2002). The slice overlay assay: a versatile tool to study the influence of extracellular signals on neuronal development. *Sci STKE* 2002, PL9.
- Polleux, F., Giger, R. J., Ginty, D. D., Kolodkin, A. L., und Ghosh, A. (1998). Patterning of cortical efferent projections by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 282, 1904-1906.
- Polleux, F., Morrow, T., und Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* 404, 567-573.
- Püschel, A. W. (1999). Semaphorins: repulsive guidance molecules show their attractive side. *Nature* 2, 777-778.
- Püschel, A. W., Adams, R. H., und Betz, H. (1995). Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. *Neuron* 14, 941-948.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* 145, 61-83.
- Raper, J. A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 10, 88-94.
- Raper, J. A., und Kapfhammer, J. P. (1990). The enrichment of a neuronal growth cone collapsing activity from embryonic chick brain. *Neuron* 4, 21-29.
- Renzi, M. J., Wexler, T. L., und Raper, J. A. (2000). Olfactory sensory axons expressing a dominant-negative semaphorin receptor enter the CNS early and overshoot their target. *Neuron* 28, 437-447.
- Rosentreter, S. M., Davenport, R. W., Loschinger, J., Huf, J., Jung, J., und Bonhoeffer, F. (1998). Response of retinal ganglion cell axons to striped linear gradients of repellent guidance molecules. *J Neurobiol* 37, 541-562.
- Ruediger, T., und Bolz, J. (2008). Acetylcholine influences growth cone motility and morphology of developing thalamic axons. *Cell Adhesion and Migration* 2, 30-37.
- Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M., und Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78, 409-424.
- Skaliora, I., Singer, W., Betz, H., und Puschel, A. W. (1998). Differential patterns of semaphorin expression in the developing rat brain. *Eur J Neurosci* 10, 1215-1229.
- Song, H., Ming, G., He, Z., Lehmann, M., McKerracher, L., Tessier-Lavigne, M., und Poo, M. (1998). Conversion of neuronal growth cone responses from repulsion to attraction by cyclic nucleotides. *Science* 281, 1515-1518.
- Song, H. J., Ming, G. L., und Poo, M. M. (1997). cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature* 388, 275-279.
- Song, H. J., und Poo, M. M. (1999). Signal transduction underlying growth cone guidance by diffusible factors. *Curr Opin Neurobiol* 9, 355-363.
- Southam, E., und Garthwaite, J. (1991). Intercellular action of nitric oxide in adult rat cerebellar slices. *Neuroreport* 2, 658-660.

- Sperry, R. (1945). Restoration of vision after crossing of optic nerves and after contralateral transplantation of eye. *Neurophysiol* 8, 15-28.
- Sperry, R. W. (1963). Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 50, 703-710.
- Spriggs, M. K. (1999). Shared resources between the neural and immune systems: semaphorins join the ranks. *Curr Opin Immunol* 11, 387-391.
- Steup, A., Ninnemann, O., Savaskan, N. E., Nitsch, R., Puschel, A. W., und Skutella, T. (1999). Semaphorin D acts as a repulsive factor for entorhinal and hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 11, 729-734.
- Stoeckli, E. T. (1997). Molecular mechanisms of growth cone guidance: stop and go? *Cell Tissue Res* 290, 441-449.
- Stoeckli, E. T., und Landmesser, L. T. (1998). Axon guidance at choice points. *Curr Opin Neurobiol* 8, 73-79.
- Suto, F., Ito, K., Uemura, M., Shimizu, M., Shinkawa, Y., Sanbo, M., Shinoda, T., Tsuboi, M., Takashima, S., Yagi, T., und Fujisawa, H. (2005). Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J Neurosci* 25, 3628-3637.
- Suto, F., Murakami, Y., Nakamura, F., Goshima, Y., und Fujisawa, H. (2003). Identification and characterization of a novel mouse plexin, plexin-A4. *Mech Dev* 120, 385-396.
- Tabata, H., und Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 23, 9996-10001.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L. H., Murakami, Y., Kalb, R. G., Fujisawa, H., und Strittmatter, S. M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 99, 59-69.
- Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R. G., und Strittmatter, S. M. (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat Neurosci* 1, 487-493.
- Takegahara, N., Kumanogoh, A., und Kikutani, H. (2005). Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 1673-1680.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G. I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M. L., Goodman, C. S., Poo, M., *et al.* (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99, 71-80.
- Tamamaki, N., Fujimori, K., Nojyo, Y., Kaneko, T., und Takauji, R. (2003). Evidence that Sema3A and Sema3F regulate the migration of GABAergic neurons in the developing neocortex. *J Comp Neurol* 455, 238-248.
- Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., und Yagi, T. (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19, 519-530.
- Tessier-Lavigne, M., und Goodman, C. S. (1996). The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.
- Uziel, D., Muhlfriedel, S., Zarbalis, K., Wurst, W., Levitt, P., und Bolz, J. (2002). Miswiring of limbic thalamocortical projections in the absence of ephrin-A5. *J Neurosci* 22, 9352-9357.
- Varela-Echavarria, A., Tucker, A., Puschel, A. W., und Guthrie, S. (1997). Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron* 18, 193-207.
- von Philipsborn, A. C., Lang, S., Loeschinger, J., Bernard, A., David, C., Lehnert, D., Bonhoeffer, F., und Bastmeyer, M. (2006). Growth cone navigation in substrate-bound ephrin gradients. *Development* 133, 2487-2495.
- Walsh, F. S., und Doherty, P. (1997). Neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily: role in axon growth and guidance. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 425-456.
- Walter, J., Kern-Veits, B., Huf, J., Stolze, B., und Bonhoeffer, F. (1987). Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development* 101, 685-696.

- Winberg, M. L., Mitchell, K. J., und Goodman, C. S. (1998a). Genetic analysis of the mechanisms controlling target selection: complementary and combinatorial functions of netrins, semaphorins, and IgCAMs. *Cell* 93, 581-591.
- Winberg, M. L., Noordermeer, J. N., Tamagnone, L., Comoglio, P. M., Spriggs, M. K., Tessier-Lavigne, M., und Goodman, C. S. (1998b). Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance. *Cell* 95, 903-916.
- Winberg, M. L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P. M., Montell, D., und Goodman, C. S. (2001). The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* 32, 53-62.
- Wolman, M. A., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., und Halloran, M. C. (2004). Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. *J Neurosci* 24, 8428-8435.
- Wolman, M. A., Regnery, A. M., Becker, T., Becker, C. G., und Halloran, M. C. (2007). Semaphorin3D regulates axon axon interactions by modulating levels of L1 cell adhesion molecule. *J Neurosci* 27, 9653-9663.
- Yamada, T., Endo, R., Gotoh, M., und Hirohashi, S. (1997). Identification of semaphorin E as a non-MDR drug resistance gene of human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 14713-14718.
- Yaron, A., Huang, P. H., Cheng, H. J., und Tessier-Lavigne, M. (2005). Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron* 45, 513-523.
- Yoshimura, T., Arimura, N., und Kaibuchi, K. (2006). Signaling networks in neuronal polarization. *J Neurosci* 26, 10626-10630.
- Zheng, J. Q., Felder, M., Connor, J. A., und Poo, M. M. (1994). Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368, 140-144.
- Zimmer, G., Kastner, B., Weth, F., und Bolz, J. (2007). Multiple effects of ephrin-A5 on cortical neurons are mediated by SRC family kinases. *J Neurosci* 27, 5643-5653.
- Zondag, G. C., Koningstein, G. M., Jiang, Y. P., Sap, J., Moolenaar, W. H., und Gebbink, M. F. (1995). Homophilic interactions mediated by receptor tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role for the novel extracellular MAM domain. *J Biol Chem* 270, 14247-14250.

## 9. Anhang

---

### 9.1. Verwendete Lösungen

Alle während eines *in-vitro*-Experimentes benötigten Lösungen waren steril. Wenn dies nicht durch den Hersteller garantiert war, erfolgte die Sterilfiltration mit Hilfe von Sterilfiltern der Porengröße 0,2 µm. Falls nicht anders erläutert, wurden die Lösungen bei 4 °C aufbewahrt.

#### Puffer

**PBS** (Phosphate Buffered Saline): Eine 10x PBS-Stammlösung (4 °C) wurde hergestellt, indem 80,0 g NaCl; 2,0 g KCl; 2,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1 l Aqua bidestillata (Bidest.) gelöst wurden. Durch eine 1:10-Verdünnung mit Bidest., wurde aus der PBS-Stammlösung der gebrauchsfertige Puffer erhalten (pH 7,4). Für sterile Arbeiten wurde das PBS autoklaviert (20 min, 121 °C bei 2 bar).

**GBSS** (Gey's Balanced Salt Solution): 16 g NaCl; 0,34 g CaCl<sub>2</sub>; 0,54 g KCl; 0,06 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,42 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 0,14 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O; 0,454 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,238 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2 g Glukose wurden in 2 l Bidest. gelöst (pH 7,4) und sterilfiltriert.

#### Lösungen für die Zellkultur mit HEK-Zellen

**Zellkulturmedium:** Als Basis für das Medium der HEK-Zellen dienten 440 ml MEM (Minimum Essential Medium). 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 50 ml fötales Kälberserum vervollständigten das Zellkulturmedium. Bei der Zellkultur mit Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-transfizierten HEK-Zellen war außerdem 0,5 % Geneticin Bestandteil des Zellkulturmediums.

**0,25 % Trypsin:** 2,5 %-iges Trypsin wurde 1:10 mit PBS verdünnt und bei –20 °C gelagert.

**Einfriermedium:** Zum Einfrieren der HEK-Zellen wurden 900 µl Zellkulturmedium und 100 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) frisch gemischt und sofort verwendet.

#### Lösungen für die Membranpräparation

**Spermidin-Stammlösung:** Die für den Homogenisierungspuffer benötigte Spermidin-Stammlösung wurde durch Auflösen von 1 g Spermidin ([N-3-Aminopropyl]-1,4-butanediamin) in 13,77 ml a.d. erhalten. Es folgte die Aufbewahrung von 400 µl-Aliquots bei –20 °C.

**Homogenisierungspuffer (H-Puffer):** Nach dem Lösen von 242,2 mg Tris-Base und 33 mg  $\text{CaCl}_2$  in 100 ml Bidest. wurden 400  $\mu\text{l}$  Spermidin zugegeben. Nach dem Auffüllen auf 200 ml mit Bidest. wurde die Lösung sterilfiltriert (pH 7,4) und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**Proteaseinhibitoren:** Um eine proteolytische Spaltung der Membranproteine zu verhindern, wurden H-Puffer und PBS mit Protease-inhibierenden Substanzen versehen: Aprotinin, 2,3-Dehydro-Neuraminsäure, Leupeptin und Pepstatin A. Die Auflösung der Proteaseinhibitoren erfolgte auf Eis in Bidest. (5 mg Aprotinin pro 200  $\mu\text{l}$ ; 10 mg 2,3-Dehydro-Neuraminsäure pro 650  $\mu\text{l}$ ; 5 mg Leupeptin pro 200  $\mu\text{l}$ ) bzw. in 100 % Ethanol (1 mg Pepstatin A pro 200  $\mu\text{l}$ ). Die Proteaseinhibitoren standen für die Membranherstellung als 20  $\mu\text{l}$ -Aliquots bei  $-20^\circ\text{C}$  zur Verfügung und konnten mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren werden.

**Sucrose-Stammlösungen:** Für eine 5 %-ige und 50 %-ige Sucrose-Stammlösung wurden jeweils 5 g bzw. 50 g Sucrose in 100 ml Bidest. gelöst und sterilfiltriert.

**2 % SDS:** Dazu wurden 2 g SDS (Natriumdodecylsulfat) in 80 ml Bidest. unter Rühren gelöst und auf 100 ml mit Bidest. aufgefüllt. Die SDS-Lösung wurde, nachdem sie durch einen Faltenfilter filtriert wurde, bei RT (Raumtemperatur) gelagert.

**PBS/Glycerol:** Die PBS/Glycerol-Lösung wurde durch Mischen von 10 ml PBS und 15 ml Glycerol hergestellt und anschließend sterilfiltriert.

## Lösungen für die Primärkultur

**65 % Glukose-Stammlösung:** 32,5 g D-(+)-Glukose wurden in 50 ml Bidest. gelöst und sterilfiltriert. Gelagert wurde die Glukose-Lösung bei  $-20^\circ\text{C}$ .

**Präpariermedium:** Zur Herstellung des Präpariermediums für sämtliche *in-vitro*-Versuche wurden jeweils 50 ml GBSS mit 500  $\mu\text{l}$  65 %-iger Glukose-Stammlösung frisch versetzt.

**Sammelmedium:** 100  $\mu\text{l}$  65 %-ige Glukose-Stammlösung wurde kurz vor dem Gebrauch mit 10 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; ohne  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{CaCl}_2$ ) gemischt.

**0,25 % Trypsin:** 2,5 %-iges Trypsin wurde 1:10 mit PBS verdünnt und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

**Kulturmedium für primäre cortikale Einzelzellen:** Zu 90 ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) wurden 150  $\mu\text{l}$  65 %-ige Glukose-Stammlösung, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin, 10000  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin) und 10 ml fötales Kälberserum hinzugefügt.

**Kulturmedium für primäre cortikale Explantate:** 0,4 g Methylzellulose wurden unter Rühren bei  $4^\circ\text{C}$  in 95 ml DMEM gelöst. Im Anschluß erfolgte die Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  65 %-iger Glukose-Stammlösung, 1 ml L-Glutamin, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml fötales Kälberserum. Zuletzt wurde das Kulturmedium sterilfiltriert.

**Kulturmedium für coronale Schnitte:** Gemischt wurden 60 ml DMEM/F12 und 30 ml HBSS. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml 65 %-iger Glukose-Stammlösung, 1 ml Penicillin/Streptomycin und 10 ml fötalen Kälberserum.

**Thrombin:** 10.000 U Thrombin wurden in 7,936 ml sterilem a.d. gelöst und nach Zentrifugation (2500 U/min, 20 °C, 30 min) bei –20 °C eingefroren. Zum Einsatz bei der Co-Kultur wurden 30 µl Thrombin mit 1 ml GBSS vermischt.

**Chloralhydrat:** Um 10 %-iges Chloralhydrat herzustellen, wurden 5 g Chloralhydrat in 50 ml a.d. gelöst. Die Lösung wurde bei RT gelagert.

### Lösungen für die Immunhistochemie

**Fixierlösung:** Zur Herstellung von 500 ml Fixierungslösung mit 4 % PFA (Paraformaldehyd), wurden 20 g PFA in 500 ml PBS unter Rühren bei 60 °C gelöst. Auf die Einstellung des pH-Wertes (pH 7,4) folgte die Filtration durch einen Faltenfilter. Aufbewahrt wurde die PFA-Lösung bei –20 °C.

**Waschpuffer:** 500 µl Triton-X-100 in 500 ml PBS ergab eine 0,1 % Triton-X-100-Lösung in PBS.

**Blockierungslösung:** 1,5 g BSA (Bovine Serum Albumin) wurden in 50 ml Waschpuffer gelöst.

**DAPI:** 50 µg DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) wurden pro 1 ml Bidest. gelöst und bei –20 °C aufbewahrt.

**Einbettmedium (Mowiol):** 25 g Mowiol wurden in 100 ml PBS über Nacht unter Rühren gelöst. Nach Zugabe von 50 ml Glycerol wurde erneut über Nacht gerührt und der pH-Wert getestet (pH 8,0 bis 8,5). Auf die Zugabe von 2 % Timerosal erfolgte die Erwärmung der Lösung bis auf 50 °C. Nach dem Abkühlen wurden 17,5 g n-Propylgallat unter Rühren gelöst. Abschließend wurde das Mowiol bei 4000 U/min für 15 min zentrifugiert. Das Einbettmedium wurde bei –20 °C gelagert.

### Lösungen für *in situ*-Hybridisierung

Die verwendeten Stammlösungen wurden vor dem Gebrauch autoklaviert (20 min, 121 °C bei 2 bar) und bei RT gelagert.

**H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub>:** 1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonat) wurde in einem 1 l Bidest. unter Rühren gelöst.

**10xPBS<sub>DT</sub>:** 1 ml DEPC wurde in einem 1 l 10x PBS unter Rühren gelöst. Eine 1x PBS<sub>DT</sub>-Lösung wurde erhalten, indem 100 ml 10x PBS<sub>DT</sub> mit 900 ml H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> verdünnt wurden (pH 7,4).



**4 % PFA / PBS:** 20 g PFA wurden in 500 ml PBS unter Rühren bei 60 °C gelöst und abschließend durch einen Faltenfilter filtriert. Die Fixierlösung (pH 7,4) wurde immer frisch angesetzt.

**TEA:** 15 g TEA (Triethanolamin) und 3,6 ml 37 % HCl wurden in H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> gelöst und auf 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> aufgefüllt (pH 8,0).

**20xSSC<sub>DT</sub>:** Um eine 20x Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung herzustellen, wurde in einem Gesamtvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O<sub>DT</sub> 175 g NaCl und 88 g Trinatriumcitrat aufgelöst (pH 7,0).

**MaBS:** Eine 5x Maleinsäure-gepufferte Saline enthielt 58,04 g Maleinsäure und 150 ml 5M NaCl in einem Gesamtvolumen von 1 l Bidest. (pH 7,5).

**Blockierungslösung:** Um eine 2 %-ige Blockierungslösung zu erhalten, wurden 4 g Blockierungsreagenz in 200 ml MaBS bei 50 °C unter Rühren gelöst.

**Reaktionspuffer:** Der Puffer für die Farbreaktion setzte sich aus 12,11 g Tris-Base, 20 ml 5 M NaCl und 1 ml 1 M MgCl<sub>2</sub> in 1 l Bidest. (pH 9,5) zusammen.

## 9.2. Materialien

### 9.2.1. Primer

Die für die genspezifische Amplifikation von Semaphorin 3A- und Semaphorin 3C-cDNA verwendeten Primer wurden von Diplom-Biochemiker Philipp Kaiser freundlicherweise zur Verfügung gestellt {Kaiser, 2005 #217}.

### 9.2.2. RNA-Sonden

Die für die Herstellung der RNA-Sonden für Semaphorin 3A und 3C notwendigen Plasmide wurden ebenfalls von Philipp Kaiser zur Verfügung gestellt {Kaiser, 2005 #217}. Diplom-Biologin Sandra Barchmann fertigte die Digoxigenin-gekoppelten RNA-Sonden für Semaphorin 3A und 3C an.

### 9.2.3. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acetanhydrid	Sigma-Aldrich
Aceton	ROTH
Agarose	Sigma-Aldrich
Aprotinin	Sigma-Aldrich
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat)	ROCHE
Blockierungsreagenz	ROCHE
Borsäure	ROTH
Bromphenolblau	ROTH
BSA (Bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Sigma-Aldrich
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich
Denhardt´s Reagenz	Eppendorf
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich
Desoxynukleotide	ROTH
DMEM (Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium)	GIBCO
DMEM/F12	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DNA-Standard	Invitrogen
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	ROTH
Ethanol	ROTH
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FBS (Fötales Kälberserum)	GIBCO
Formamid	Sigma-Aldrich
Geneticin	Sigma-Aldrich
D(+)-Glukose	MERCK
L-Glutamin	GIBCO
Glycerol	Sigma-Aldrich
HBSS (Hanks´ Balanced Salt Solution)	GIBCO
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	MERCK
Laminin	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich

Levamisol	Sigma-Aldrich
Maleinsäure (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> )	MERCK
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	MERCK
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	GenAxxon
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	MERCK
Methylzellulose	Sigma-Aldrich
MEM (Minimum Essential Medium)	GIBCO
Mowiol	Hoechst
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
NBT (Nitroblautetrazolium)	ROCHE
N-Propylgallat	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	GIBCO
Pepstatin	Sigma-Aldrich
PFA (Paraformaldehyd)	MERCK
Ribonuklease-Inhibitor	Fermentas
Plasma vom Huhn	Sigma-Aldrich
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Q-Solution	Quiagen
Repel-Silane ES	GE Healthcare
RNase away	Molecular Bio Products
Salzsäure (HCl)	ROTH
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad-Laboratories
Spermidin (N-[3-Aminopropyl]-1,4-butan- diamin)	Sigma-Aldrich
Sucrose	Sigma-Aldrich
Thrombin	Sigma-Aldrich
Timerosal	Sigma-Aldrich
Triethanolamin (TEA)	Sigma-Aldrich
Trinatriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	ROTH
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich

Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxy-ethanol)	Sigma-Aldrich
Trizol®	Invitrogen
Trypsin	Sigma-Aldrich

#### 9.2.4. Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	ROCHE	1:1500
Cy3 konjugiert-Ziege-anti Maus IgG	Jackson Immuno Research	1:400
Kaninchen-anti Neuropilin 2, polyklonal	SANTA CRUZ	1:400
Maus-anti SMI312, polyklonal	Sternberger Monoclonals Inc.	1:1000

#### 9.2.5. Enzyme

Name	Hersteller
Reverse Transkriptase "RevertAID™ H Minus M-MuLV"	Fermentas
HotStart Taq-Polymerase	GenAxxon Bioscience
Restriktionsendonuklease <i>Apa</i> I	Fermentas
Restriktionsendonuklease <i>Pvu</i> II	Fermentas

#### 9.2.6. Geräte

Name	Hersteller
Brutschrank "HERA cell"	HERAEUS
Deckgläser	Menzel-Gläser
Festwinkelrotor 3331	HERAEUS
Gel-Dokumentationssystem	Biometra
Gelkammer	BioRad
Gewebehacker	The Mickle Laboratory Engineering

Hot-bead-Sterilisator	Fine Science Tools
Hybridisierungssofen	GFL
Kanalmatrize	Frau Susanne Lang, Tübingen
Laminarbox "HERA safe"	HERAEUS
Maschennetz	SCHÜTT
inverses Mikroskop Axiovert S-100	ZEISS
2 Photonen konfokales Laser-Scanning Mikroskop LSM-510	ZEISS
Nylonmatrize	Frau Susanne Lang, Tübingen
PCR-Maschine	Biometra
Polycarbonatfilter	COSTAR
Schwingrotor TH-641	SORVALL
SPOT Kamera	Visitron Systems
Stereomikroskop "SV6"	ZEISS
Thermomixer "compact"	EPPENDORF
Trockenschrank	HERAEUS
Ultraschallbad "RK 31"	Bandelin electronic
Ultrazentrifuge "Pro 80"	SORVALL
Ultrazentrifugenröhrchen (12 ml)	SORVALL
UV-Spektrometer "NanoDrop"	PeqLab
UV-Spektrometer "UV-1601"	SHIMADZU
Zellkulturschalen (Durchmesser: 14 cm)	NUNC
Zentrifuge "Biofuge Stratos"	HERAEUS
Zentrifuge "5810R"	EPPENDORF

### 9.3. Abkürzungen

E<sub>n</sub> – Embryonalstadium, n = Tag nach der Paarungsnacht

P<sub>n</sub> – Postnatalstadium, n = Tag nach der Geburt

P0 – Tag der Geburt

Abb.	Abbildung
a.d.	Aqua destillata
anti-npn2	Antikörper gegen Neuropilin-2
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
Bidest.	Aqua bidestillata
BSA	Bovine Serum Albumin
CAM	Zelladhäsionsmolekül
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cm	Zentimeter
CP	cortikale Platte
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Differentieller Interferenz Kontrast
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSK3β	Glykogen Synthase Kinase-3β
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney-Zellen
H-Puffer	Homogenisierungspuffer
Ig	Immunglobulin
IZ	Intermediärzone
kb	Kilobasen
kDa	kiloDalton
L	Liter
LGE	laterale ganglionische Eminenz
MaBS	Maleinacid Buffered Saline
MZ	Marginalzone
MEM	Minimum Essential Medium
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

mg	Milligramm
MGE	mediale ganglionische Eminenz
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
NBT	Nitroblautetrazolium
NCAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
npr2	Neuropilin-2
n.s.	nicht signifikant
NT-3	Neurotrophin-3
OD	optische Dichte
OTK	Off-Track
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PLL	Poly-L-Lysin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sema	Semaphorin
siRNA	kleine inhibierende RNA
SP	Subplatte
SP-Domäne	Sex-Plexin-Domäne
SSC	Natriumcitrat-gepufferte Kochsalzlösung
SVZ	Subventrikularzone
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEA	Triethanolamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
U	Units
U/min	Umdrehungen /Minute
VZ	Ventrikularzone
ZNS	Zentralnervensystem

## 9.4. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter selbständig angefertigt, und keine als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder sinngemäß übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Bearbeitung und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Sandra Barchmann bei der Durchführung *in-situ*-Hybridisierung an den verschiedenen Semaphorin-Zelllinien.
2. Philipp Kaiser bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Charakterisierung der Zelllinien.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Promotionsberatern oder anderen Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät ist mir bekannt.

Jena, den 16. Mai 2008

Tina Rüdiger



## 9.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Bolz, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Arbeit in seinem Labor und seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Er stand mir stets als hilfreicher Diskussionspartner zur Verfügung und half insbesondere bei der Zusammenstellung dieser Arbeit. Zudem ermöglichte er mir einen Auslandsaufenthalt in Frankreich und die Teilnahme an neurowissenschaftlichen Kongressen. Beides war für meine wissenschaftliche Arbeit sehr wichtig und bereichernd.

Dr. Dominique Bagnard danke ich für die technische Einführung in die Herstellung von Membrangradienten. Er stellte außerdem die verschiedenen Semaphorin-Zelllinien zur Verfügung.

Ein großes Dankeschön geht an André Güllmar und Geraldine Zimmer. Auf André konnte ich immer zählen, wenn ich technische Probleme hatte, sei es mit Computern oder Mikroskopen. Zudem war er unersetzlich beim Korrekturlesen meiner Arbeit. Geraldine hatte stets ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art. Durch die jahrelange freundschaftliche und unkomplizierte Atmosphäre unserer Zusammenarbeit seid ihr zu meinen besten Freunden geworden und gabt mir stets Kraft und Motivation für meine Arbeit.

Bei Frau Raue möchte ich mich für die hilfreiche und sorgfältige technische Assistenz bedanken. Frau Woker, unserer Tierpflegerin, sei für die Versorgung meiner Experimente mit Mäusen gedankt.

Unserer Sekretärin Frau Behr danke ich für die stets freundliche organisatorische Unterstützung, insbesondere wenn es um Bestellungen für das Labor und unsere Milchversorgung ging.

Sandra Barchmann danke ich für die zur Verfügung gestellten Sonden und ihre Unterstützung bei der Durchführung der *in-situ*-Hybridisierungen. Auch allen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie sei an dieser Stelle gedankt. Die Arbeit am Institut hat mir stets große Freude gemacht.

Dr. Franco Weth schulde ich ein besonderes Dankeschön, er hatte stets ein offenes Ohr für Fragen aller Art. Er ermöglichte mir in seiner Nachwuchsgruppe die Semaphorin-Zelllinien molekularbiologisch zu charakterisieren. Für die professionelle Anleitung zur PCR danke ich auch Philipp Kaiser.

Dr. Tobias Pöhlmann danke ich für das Korrekturlesen und für die freundschaftliche und angenehme Zusammenarbeit, auch wenn die FACS-Daten in meiner Doktorarbeit keine Anwendung fanden.

Auch möchte ich Natja Haag, Ronny Niehage, Bettina Kästner und Judith Rudolph nicht unerwähnt lassen. In den letzten Monaten meiner Doktorarbeit war mir der gemeinsame Mensagang eine immer sehr willkommene Abwechslung.

Frau Prof. Dr. Siegrid Löwel und Frau Prof. Dr. Daniela Uziel danke ich für die Übernahme der Zweit- und Drittgutachten.

Ein lieber Dank geht an meine Eltern, Großeltern und Danny. Eure Unterstützung, und dass ihr immer hinter mir standet, hat meine Doktorarbeit erst ermöglicht. Danke!

## 9.6. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Tina Rüdiger

Geboren am 22.08.1978 in Gera

### Schulbildung

1985 – 1989	Polytechnische Oberschule Töppeln
1989 – 1991	Karl - Marx - Oberschule Harpersdorf
1991 – 1997	Friedrich - Schiller - Gymnasium Gera
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,2

### Hochschulbildung

1997 – 2003	Studium der Diplom-Biologie an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  Hauptfach: Zoologie; Nebenfächer: Anthropologie und Immunologie
2002 – 2003	Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena  Thema: „Die Bedeutung von Acetylcholin auf die Entwicklung thalamocortikaler Projektionen“
April 2003	Diplom der Biologie (Titel Diplom-Biologe), Note: 1,1

### Promotion

seit 2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Allgemeine Zoologie und  Tierphysiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena mit dem Ziel  einer Promotion
-----------	--

## 9.7. Eigene Publikationen

- Bertrand Gonthier, Cécile Nasarre, Tina Rüdiger and Dominique Bagnard: Protocol for the primary culture of cortical neurons. In: New methods for culturing cells from nervous tissue, Karger, 2005.
- Tina Rüdiger and Jürgen Bolz: Neurotransmitter and the development of neuronal circuits. In: Axon growth and guidance, Landes Bioscience, 2007.
- Tina Rüdiger and Jürgen Bolz: Acetylcholine influences growth cone motility and morphology of developing thalamic axons. In: Cell Adhesion & Migration, 2008. 2 (1).

### Abstracts

- Tina Rüdiger and Jürgen Bolz: Thalamic growth cone behavior regulated by the neurotransmitter acetylcholine: Running on the spot. Abstract. In Göttingen Neurobiology Report 2003: Proceedings of the German Neuroscience Society 2003; 28<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Georg Thieme Verlag.
- Tina Rüdiger and Jürgen Bolz: Regulation of thalamic growth cone behavior by the neurotransmitter acetylcholine. Abstract. 4<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience by the Federation of European Neuroscience Societies, Lisbon 2004.
- Tina Rüdiger, Dominique Bagnard and Jürgen Bolz: Semaphorin gradients induce chemorepulsion and chemoattraction of cortical growth cones. Abstract. 34<sup>th</sup> annual meeting by the Society of Neuroscience, San Diego 2004.
- Tina Rüdiger, Dominique Bagnard and Jürgen Bolz: Semaphorin gradients induce chemorepulsion and chemoattraction of cortical growth cones. Abstract. 29<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen 2005.
- Tina Rüdiger, Dominique Bagnard and Jürgen Bolz: Effects of semaphorin gradients on cortical neurons. Abstract. 30<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen 2007.

**Im Folgenden sind drei Publikationen angehängt:**

**1. Protocol for the primary culture of cortical neurons.**

Bertrand Gonthier, Cécile Nasarre, Tina Rüdiger and Dominique Bagnard

In: New methods for culturing cells from nervous tissue.

BioValley Monogr. Basel, Karger, 2005, vol 1, pp 12-22 (DOI: 10.1159/000083430).

Diese Publikation ist ein Buchkapitel über die Kultivierung von neuronalem Gewebe. Alle Kultivierungsmethoden, die auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung fanden, sind ausführlich beschrieben.

## **2. Neurotransmitters and the development of neuronal circuits.**

Tina Ruediger and Juergen Bolz

In: Axon growth and guidance.

Landes Bioscience, 2007, pp 104-115 (ISBN: 978-0-387-76714-7).

Publiziert wurde ein Buchkapitel über die Beeinflussung der Axonlenkung durch Neurotransmitter. Die Regulation der axonalen Lenkung durch Neurotransmitter, insbesondere durch Acetylcholin, war Thema der Diplomarbeit.

**3. Acetylcholine influences growth cone motility and morphology of developing thalamic axons.**

Tina Ruediger and Juergen Bolz

In: Cell Adhesion & Migration, 2008. 2 (1).

Während der Promotion wurden ergänzende Experimente zur Diplomarbeit durchgeführt. Die dazugehörige Publikation erschien Anfang 2008.